

**CIRO RAFAEL CRIMINÁCIO**

**QSOX RECOMBINANTE DE MAMÍFERO: PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E  
ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

**CURITIBA**

**2007**

**CIRO RAFAEL CRIMINÁCIO**

**QSOX RECOMBINANTE DE MAMÍFERO: PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E  
ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular, Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná

**Orientador:**

Profa. Dra. Lia Sumie Nakao

**Co-orientador:**

Prof Dr Silvio Marques Zanata

**CURITIBA**

**2007**

## **AGRADECIMENTOS**

- A DEUS por ter me dado a vida e a capacidade de pensar
- À minha família por todo apoio, especialmente a meu pai que fez de tudo para que eu continuasse a estudar
- A todos os meus amigos pela força
- Aos meus orientadores Lia Sumie Nakao e Silvio Marques Zanata pela amizade, orientação e pela oportunidade sem a qual não poderia realizar este trabalho
- A todos os meus novos amigos conquistados durante esta fase, pela ajuda, troca de idéias e companheirismo
- Ao professor Silvio Sanches Veiga pela colaboração, por disponibilizar seu laboratório para que eu fizesse parte de meus experimentos
- Aos alunos do laboratório de matriz extracelular pela amizade e pela ajuda com os equipamentos do laboratório
- Aos alunos do IBMP pela atenção e pela amizade conquistada
- Aos professores Stênio Perdigão e Cláudia Duarte dos Santos pela colaboração, atenção e por terem cedido seus laboratórios para que eu pudesse avançar nos experimentos com QSOX humana
- Ao professor Roberto Pecoits da PUC-PR pela amizade, incentivo e motivação a pesquisa
- Aos membros da comissão avaliadora, Professor Carlos Aita e Professora Giseli Klassen

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALR	augumenter of Liver Regeneration
bp	pares de base
DTT	ditiotreitól
DTNB	ácido ditionitrobenzólico
ERV	essential for respiration and vegetative growth
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
GSH	glutathiona
GRX	glutarredoxina
HRP	peroxidase de Raiz Forte
HVA	ácido Homovanílico
IMAC	cromatografia de afinidade a Metal Imobilizado
IPTG	isopropil- $\beta$ -d-tiogalactopiranosídeo
LB	meio Luria Bertani
Ni-NTA	níquel-ácido nitrilotriacético
nt	nucleotídeo
PBS	salina tamponada com fosfato
PDI	proteína dissulfeto isomerase
QSOX	quiescina Sulfidril Oxidase
QSOXh	quiescina Sulfidril Oxidase Recombinante Humana
QSOXm	quiescina Sulfidril Oxidase Recombinante Camundongo
QSOXrec	quiescina Sulfidril Oxidase Recombinante
ROS	espécies Reativas de Oxgênio
RNS	espécies Reativas de Nitrogênio
SDS-PAGE	dodecil sulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamida
TRX	tiorredoxina

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5 CONCLUSÃO.....	43
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

## RESUMO

Sulfidril oxidases são enzimas que catalisam a formação de dissulfetos em peptídeos e proteínas com a redução do oxigênio molecular para peróxido de hidrogênio. Duas famílias de sulfidril oxidases dependentes de FAD foram descritas até agora: a família QSOX (quiescina sulfidril oxidase) e a família ERV/ALR (essential for respiration and vegetative growth/augmenter of liver regeneration). Os membros da família QSOX compartilham seqüências semelhantes e seqüências de aminoácidos características. Estas enzimas possuem um domínio N-terminal tiorredoxina-PDI (proteína dissulfeto isomerase) e um domínio C-terminal ERV com o sitio de ligação de FAD. A família QSOX inclui a quiescina humana de fibroblasto de pulmão e as sulfidril oxidases de clara de ovo de galinha, vesícula seminal de rato, células endometriais de porcos da índia e epiderme de rato. As QSOX parecem ser essenciais em algumas funções celulares como no dobramento de proteínas, elaboração da matriz extracelular, regulação do estado redox e no controle do ciclo celular. Este trabalho teve como objetivo expressar a QSOX de mamífero de células musculares lisas humanas e cerebelo de camundongo em sistema recombinante heterólogo de *E. coli*, purificar a proteína produzida por IMAC (cromatografia de afinidade a metal imobilizado) e analisar sua atividade enzimática usando como substratos DTT, GSH e cisteína. Os resultados mostram que apenas a QSOX de camundongo foi produzida com atividade e que diferentes valores de pH da reação, alteram sua funcionalidade. Concluindo, a enzima QSOX recombinante produzida em nosso laboratório dará suporte para próximos experimentos, na tentativa de encontrar possíveis funções para a enzima.

Palavras chave: estresse oxidativo, estado redox, sulfidril oxidase, QSOX, atividade enzimática

## ABSTRACT

Sulphydryl oxidases are enzymes that catalyze the formation of disulfide bonds in peptides and proteins with the reduction of molecular oxygen to hydrogen peroxide. Two families of FAD-linked sulphydryl oxidases have been described so far: the QSOX (quiescin sulphydryl oxidase) family and the ERV/ALR (essential for respiration and vegetative growth/augmenter of liver regeneration) family. QSOX members share strong cDNA sequence identities and common amino-acidic sequence features. They display an N-terminal thioredoxin PDI (protein disulphide isomerase)-like domain and a C-terminal ERV1-like domain, which contains the FAD-binding site. The QSOX family includes the human quiescin Q6 from lung fibroblasts and sulphydryl oxidases from chicken egg White, rat seminal vesicles, guinea-pig endometrial cells and mouse epidermis. Quiescin/sulphydryl oxidase (QSOX) proteins have been implicated in essential cellular functions such as protein folding, elaboration of the extracellular matrix, regulation of the redox state and control of the cell cycle. The aim of this work was to express mammalian QSOX from human smooth muscle cells and mouse cerebellum in *E. coli* recombinant system, purify the protein by IMAC (immobilized metal affinity chromatography) and analyze its enzymatic activity using some substrates like DTT, GSH and cysteine. Results show that only mouse QSOX was produced in an active form and that different pH values alters its activity. In conclusion, the recombinant QSOX produced in our laboratory will give support for next experiments trying to find out possible functions to the enzyme.

Key words: oxidative stress, redox state, sulphydryl oxidase, QSOX, enzymatic activity

# 1 INTRODUÇÃO

## 1 Estado redox intra e extracelular

A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) é um fenômeno biológico comum na vida das células eucarióticas. Os efeitos das ROS, entre eles, estresse oxidativo, patogênese e envelhecimento tem sido alvo de muitos estudos e cada vez mais cresce o interesse dos pesquisadores sobre os mecanismos desenvolvidos por essas espécies reativas para causarem dano e morte celular (DALLE-DONNE et al., 2007). Os ROS não são apenas agentes maléficos às células, mas também responsáveis por inúmeros processos de sinalização que regulam o crescimento, diferenciação, proliferação e morte celular (JI et al., 2007). Com certeza o entendimento de como as células controlam a produção de ROS e regulam os processos de transdução de sinal é essencial para a prevenção de doenças e melhora do funcionamento celular. O aumento dos níveis de ROS pode danificar macromoléculas dentro das células sendo este dano aos lipídeos, proteínas e ao DNA que leva a consequências patológicas ao organismo (ELLIS, 2007).

O estresse oxidativo ou oxidante ocorre quando o balanço dos oxidantes dentro da célula excede os níveis dos antioxidantes presentes (ELLIS, 2007) da mesma forma, quando a geração de radicais livres excede a capacidade dos mecanismos de defesa antioxidantes (AHAMED, 2007). Este desbalanço pode aumentar e causar dano celular em uma variedade de condições patológicas, incluindo doenças cardiovasculares e aterosclerose, hipertensão, doenças inflamatórias, complicações diabéticas, isquemia e doenças neurodegenerativas.

Com a formação de um ambiente contendo altas concentrações de oxigênio, organismos aeróbicos são expostos à ROS, os quais são formados durante o metabolismo celular e no ambiente. Estas ROS e RNS (espécies reativas de nitrogênio) são formadas usualmente em baixas concentrações sob condições normais. Os ROS ou RNS podem ser radicais, contendo um par de elétron desemparelhado, ou oxidantes de outras naturezas químicas, como moléculas ( $H_2O_2$ ), ou íons (peroxinitrito). Dependendo de sua reatividade alguns radicais e oxidantes são capazes de reagir com componentes celulares e os destruírem. As proteínas estão entre os alvos principais do dano oxidativo (DALLE-DONNE et al., 2007; JUNG et al., 2007). Como a formação de oxidantes e radicais dentro da célula é inevitável, durante a evolução uma variedade de mecanismos



de defesa formou-se contra estes oxidantes. Isto inclui a direta interação e detoxificação dos oxidantes, catalizado por numerosos sistemas enzimáticos, como a superóxido dismutases, catalases e o sistema glutathione redutase que catalisa a reação de redução do GSH para GSSG em presença de NADPH, ou através de substâncias de baixo peso molecular chamados de antioxidantes. Estas substâncias interagem com os oxidantes e formam produtos menos reativos que são excretados ou metabolizados posteriormente. Entretanto, como estes sistemas não são perfeitos, todas as células estão equipadas com uma bateria de diferentes mecanismos de reparo e enzimas que removem os produtos danificados. Para a maioria das proteínas danificadas a degradação é a única maneira de remover estas proteínas do ambiente intracelular. Como os únicos aminoácidos capazes de serem reduzidos novamente são a cisteína e a metionina, os outros aminoácidos não podem ser reparados. A formação de tais aminoácidos dentro de uma proteína requer a degradação da mesma (JUNG et al., 2007).

Em células eucarióticas, as ligações dissulfeto protéicas são formadas quando a cadeia polipeptídica das proteínas secretadas entra no lúmen do retículo endoplasmático (RE) (SEVIER, 2001). Cada ligação dissulfeto introduzida em proteínas no RE requer a remoção de dois elétrons por um composto de baixo peso molecular ou uma proteína catalítica (THORPE, 2002), sendo que as ligações dissulfeto são essenciais para a estabilidade e função de diversas proteínas (SENKEVICH, 2000). Dentre estes compostos de baixo peso molecular está a glutathione (GSH), cuja forma oxidada é a glutathione dissulfeto (GSSG).

Sob condições de estresse oxidativo/nitrosativo, os tióis de resíduos de cisteína dentro de proteínas estão entre os principais alvos susceptíveis sensíveis aos oxidantes e podem passar por várias alterações redox reversíveis ou irreversíveis em resposta ao aumento ou exposição às ROS/RNS (DALLE-DONNE et al., 2007). Dependendo do resíduo de cisteína afetado pode alterar completamente a função da proteína. Sendo que a cisteína está presente no sítio ativo de muitas proteínas e em domínios que funcionam na regulação e no tráfego, sinalização celular e expressão de genes. Para aquelas proteínas que não contêm resíduos de cisteína importante para sua função, a modificação destes tióis pode alterar a conformação da proteína fazendo com que esta perda sua atividade. A exposição das cisteínas na superfície da proteína serve como sensor redox da célula. Estas alterações redox nos tióis protéicos são facilmente reversíveis através de mecanismos que incluem a GSH principalmente (DALLE-DONNE et al., 2007; JUNG et al., 2007; THORPE, 2007).

A glutathiona é um tripeptídeo (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinilglicina) que está presente nas células em concentrações milimolares ( $\sim 1$ -10mM), e a taxa de GSH para glutathiona oxidada (GSSG) é crítica para o balanço redox celular (DALLE-DONNE et al., 2007). O par GSH/GSSG é o principal tampão redox intracelular e desempenha uma função essencial na proteção celular contra o dano oxidativo. GSH e GSSG também são encontrados fora das células, mas geralmente em pequenas quantidades. A maioria do GSH nas células é encontrado no citosol. GSH no núcleo mantém o estado redox de proteínas sulfidrilas críticas, que são necessárias para o reparo e expressão do DNA (SCHAFFER E BUETTNER, 2001; DALLE-DONNE et al., 2007). Além disso, mudanças nos níveis de GSH modulam a expressão de diversos genes envolvidos no controle do crescimento e diferenciação celular (ANGELINI, 2002).

O estado redox é diferente nos vários compartimentos celulares. O citoplasma apresenta um ambiente redutor, onde a maioria das cisteínas protéicas estão em seu estado reduzido devido aos altos níveis de GSH intracelular; o ambiente extracelular é mais oxidado e a maioria das proteínas secretadas são ricas em dissulfetos. As proteínas da membrana celular estão na interface entre estes dois compartimentos podendo ter uma função central na sinalização redox do ambiente celular, levando em consideração a localização celular que as tornam sensíveis a oxidantes ou redutores exógenos. (LARAGIONE, 2006). Os tióis afetam uma variedade de funções celulares, um efeito conhecido como regulação redox, largamente atribuída à modificação de fatores de transcrição e mecanismos intracelulares de sinalização. Desde que tióis de proteínas exofaciais estão mais expostos a ação redox de moléculas usadas em culturas celulares, atribui-se que estes tióis possam representar sensores do estado redox do ambiente, através da investigação da susceptibilidade destes na regulação redox (LARAGIONE, 2006).

Como no ambiente intracelular, o estado redox do meio extracelular também é importante sendo regulado por proteínas na superfície celular com cisteínas ativas importantes (JIANG, 1999; SAHAF, 2004; LARAGIONE, 2003). Diversos trabalhos demonstram atuações de outras proteínas no controle do estado redox extracelular (THORPE, 2007; DALLE-DONNE et al., 2007; THORPE, 2006). Estas proteínas tipicamente contêm múltiplas pontes dissulfeto essenciais para sua integridade estrutural. Essas cisteínas protéicas possuem grupos sulfidrilas que estão disponíveis para a regulação do estado redox. Como as cisteínas intracelulares, as extracelulares também são críticas para a função destas proteínas (SAHAF, 2004) e grupos sulfidrilas

críticos em proteínas chaves afetam uma variedade de funções celulares, sendo responsáveis pela regulação redox celular (LARAGIONE, 2003). Diversas são as proteínas dependentes do equilíbrio tiol/dissulfeto para que possam desencadear suas funções (JUNG et al., 2007; ELLIS, 2007; THORPE, 2007). A importância deste equilíbrio é demonstrada em trabalhos não tão recentes e continua até hoje sendo alvo de muitos estudos. Elliot, 1982 já demonstrava tal importância na molécula da fibronectina. Quando esta molécula tem suas pontes de dissulfeto reduzida pelo DTT (ditiotreitól) ocorre a redução de sua afinidade pela gelatina e fibrina; desdobramento de regiões da molécula e alteração na susceptibilidade de regiões que sofrem clivagem proteolítica e a promoção de ligações cruzadas entre moléculas de fibronectina (SAHAF, 2004).

Os efeitos celulares dos oxidantes e antioxidantes apontam para a identificação dos alvos moleculares da regulação redox. Neste respeito, a oxidorredução de cisteínas protéicas tem um papel principal, como a oxidação de tióis é reversível e pode ser catalisada por várias proteínas dissulfeto oxidorredutases (LARAGIONE, 2006).

Mudanças no balanço redox celular, diminuição da taxa GSH/GSSG, bem como aumento na concentração de ROS ou RNS, estresse oxidativo/nitrosativo pode induzir a formação reversível de dissulfetos mistos entre grupos sulfidril de proteínas (PSH) e a glutathiona (S-glutathionilação) em muitas proteínas, as quais fazem da glutathiona celular um fator modulador crucial para um eventual aumento no número de proteínas oxidadas ou reduzidas (DALLE-DONNE et al., 2007).

A S-glutathionilação corresponde a adição de  $GS^-$  em resíduos protéicos de cisteína de baixo pKa. A S-glutathionilação não ocorre somente nos casos de estresse oxidativo/nitrosativo, mas também em diversas situações fisiológicas, na qual a S-glutathionilação produz efeitos modulatórios na função da proteína. O fato que as proteínas S-glutathioniladas (PSSG) estão envolvidas em muitos processos fisiológicos como crescimento, diferenciação, progressão do ciclo celular, atividade transcricional, funções do citoesqueleto e metabolismo, sugerem que a S-glutathionilação possa ser o mecanismo geral da regulação redox. A S-glutathionilação pode ocorrer por diversas reações: (i) interação direta entre grupo sulfidril protéico parcialmente ativado, radical tiil, ácido sulfênico ou proteínas S-nitrosadas (MARTINEZ-RUIZ et al., 2007) e glutathiona; (ii) reações tiol/dissulfeto entre tióis protéicos e GSSG ou PSSG; (iii) reações entre tióis protéicos e S-nitrosotiois intermediários, como a S-nitrosoglutathiona (GSNO), que é capaz de modificar PSH por ambos proteína S-nitrosação e S-

glutathionilação; (iv) interação direta com um resíduo cisteinil protéico livre e glutathiona, desencadeado por muitos oxidantes (DALLE-DONNE et al., 2007). As principais funções da S-glutathionilação seriam na manutenção das concentrações de glutathiona dentro da célula; proteção dos tióis protéicos contra modificações irreversíveis e destruição das proteínas em resposta aos altos níveis de estresse oxidativo.

A principal característica que faz da S-glutathionilação um possível mecanismo regulatório é a sua reversibilidade. A deglutathionilação é a remoção da GSH das PSSG e pode ocorrer quando o ambiente se torna mais redutor dependente ou independente de enzimas. A deglutathionilação pode ocorrer via reações de troca tiol/dissulfeto com a glutathiona e por meios de reações enzimáticas (SCHAFFER E BUETTNER, 2001). As enzimas capazes de reduzir as proteínas glutathioniladas são: glutathioninas (GRX; tioltransferases)/glutathionina redutase, as tioredoxinas (TRX)/TRX redutase e a sulfiredoxina (DALLE-DONNE et al., 2007).

## **2. Principais Tiol Proteínas**

### **2.1 Superfamília Tiorredoxina (TRX, GRX e PDI)**

As tiol/dissulfeto oxidoreduções, proteínas que contêm o sítio ativo CXXC são encontradas em todas as células. Representantes bem conhecidos desta grande família protéica são as tioredoxinas-TRX (CGPC), glutathioninas-GRX (CPYC), proteínas dissulfeto isomerases-PDI (CGHC) e a proteína periplasmática bacteriana tiol/dissulfeto oxidoredução Dsb (CPHC) (LUDEMANN et al., 1998).

As famílias TRX, GRX e PDI contêm sítio ativo Cys-X-X-Cys que é essencial para função regulatória do estado redox. Elas catalisam a redução das ligações dissulfeto e se tornam concomitantemente oxidadas formando um dissulfeto intramolecular no domínio Cys-X-X-Cys. A enzima oxidada é então reduzida pela TRX redutase no caso da TRX ou pela glutathionina redutase no caso da GRX (DALLE-DONNE et al., 2007).

As tioredoxinas compreendem um grupo de proteínas, cuja sequência altamente conservada (-W-C-G-P-C-), participa na redução de uma ampla gama de proteínas, através de um mecanismo de troca tiol/dissulfeto (MORA-GARCÍA et al., 1995). As TRX são pequenas oxidoreduções que funcionam como doadores de hidrogênio para proteínas alvo. Seu envolvimento na resposta ao estresse oxidativo está bem estudado

em bactérias, leveduras e em células animais (BROIN et al., 2000). A função fisiológica da TRX em diferentes organismos evoluiu de uma reação comum, para um amplo número especializado de funções. Isso inclui sua função bem conservada como a alta capacidade em doar hidrogênio para outras proteínas redutoras, função esta dividida com as GRX, até funções altamente especializadas na defesa contra estresse oxidativo e no controle da apoptose (ARNÈR et al., 2000). Não todas, mas a maioria destas funções exercidas pela TRX é dependente do sistema TRX redutase e, portanto dependente de NADPH e da atividade da TRX redutase (WANG et al., 1998; WILLIAMS Jr et al., 2000).

As duas principais TRX de mamíferos são a TRX-1, uma forma citosólica e nuclear e a TRX-2, uma forma mitocondrial. As TRX-1 foram melhor estudadas porque participam de muitos eventos biológicos incluindo a doação de equivalentes redutores, a regulação da atividade de fatores de transcrição, estimulação do crescimento celular e inibição da apoptose (POWIS E MONTFORT, 2001).

As TRX estão envolvidas em uma variedade de doenças humanas incluindo o câncer. O aumento dos níveis de TRX está presente em muitos tumores, onde está associado ao crescimento agressivo de tumores, por isso drogas estão sendo desenvolvidas para que inibam a TRX e que tenham atividade antitumoral (KINNULA et al., 2004; POWIS E MONTFORT, 2001; BERTINI et al., 1999).

As glutarredoxinas são pequenas tiol dissulfeto oxidorreduções, com um sítio ativo -CXXC- ou -CXXS- e um sítio de reconhecimento do GSH. Elas pertencem à superfamília da tioredoxina. De acordo com a presença de um ou dois resíduos de cisteína no sítio ativo da GRX, elas foram divididas em duas categorias: mono e ditiol glutarredoxinas. As ditiol catalisam a redução de tióis dissulfeto envolvendo dois grupos cisteína e de dissulfetos mistos entre um resíduo de cisteína protéico e uma glutatona. Ao contrário, o mecanismo de ação das GRX monotiol envolvem exclusivamente a deglutationilação de dissulfetos mistos. As GRX usam a energia redutora do GSH para catalisar reduções de dissulfetos. Essas enzimas catalisam preferencialmente reduções de dissulfetos mistos. As glutarredoxinas estão distribuídas em múltiplos organismos e ainda não se conhecem as funções dessas proteínas nas células e nas diferentes organelas celulares (PELTONIEMI et al., 2006). Sabe-se que elas participam na defesa contra o estresse oxidativo e também pode atuar na diferenciação celular, regulação redox de transdução de sinais e na prevenção da apoptose (DALLE-DONNE et al., 2007; THORPE et al., 2007; PELTONIEMI et al., 2006). Estudos não tão recentes já

demonstravam a interação da GRX de *E. coli* com proteínas glutationiladas, como por exemplo, RNase e seu papel no retículo endoplasmático atuando com outras proteínas neste compartimento celular (LUNDSTROM-LJUNG et al., 1998). As glutarredoxinas também parecem ser essenciais na inclusão de centros ferro/enxofre em algumas proteínas. Na fase lag de algumas bactérias, os resíduos de cisteína de algumas proteínas, como a apoFNR (regulador da fumarato nitrato redutase) de *E. coli* são reduzidos por ação de GRX para a inclusão desses centros Fe/S (ACHEBACH et al., 2004). Um estudo semelhante mostra que a GRX tanto de eucariotos como de procariotos pode substituir a função da GRX5 na biogênese de centros Fe/S na mitocôndria de fungos (MOLINA-NAVARRO et al., 2006). O grupo de Jacquot 2001 trabalhou com GRX de planta inserindo diversas mutações no sítio ativo da enzima. Todos os mutantes produzidos não obtiveram maior atividade quando comparado com a proteína nativa. Mesmo transformando o sítio ativo da GRX em um sítio parecido com o da TRX não observaram maior capacidade catalítica da GRX (ROUHIER et al., 2001). A função da GRX no desenvolvimento foi mostrado por Chang-Hoon, 2006 superexpressando a enzima em *Dictyostelium discoideum*. Níveis aumentado de GRX afeta o crescimento das lesmas, confirmando que a alteração do estado redox celular altera a diferenciação celular (CHANG-HOON et al., 2006). Trabalhos mais recentes mostram a relação das GRX com as reações de glutathionilação/deglutathionilação que são importante para a regulação redox de diversas proteínas (MARTINEZ-RUIZ et al., 2007; DALLE-DONNE et al., 2007; PELTONIEMI et al., 2006; CHANG-HOON et al., 2006).

A PDI é uma proteína multifuncional que está envolvida em diferentes aspectos do dobramento protéico (WINTER et al., 2007). É uma proteína encontrada em diversos compartimentos celulares incluindo o retículo endoplasmático, superfície celular, o citoplasma e o núcleo (SLISKOVIC et al., 2006). A principal função da PDI é a redução, oxidação, isomerização e a organização de ligações dissulfeto em proteínas alvo (HORIBE et al., 2004; WINTER et al., 2007). O sítio ativo da PDI contém dois tióis que sofrem alterações conforme as mudanças do estado redox (SLIKOV et al., 2006).

A PDI tem duas regiões distintas que contém o domínio (CGHC). Esta sequência é similar a um domínio encontrado na TRX (CGPC), que também é chamado de domínio TRX ou domínio CXXC. O domínio CGHC serve como sítio ativo da PDI para a reação de troca tiol/dissulfeto (HORIBE et al., 2004). A proteína cristalizada de

levedura revela que existe diferenças entre os dois sítios ativos e suas respectivas funções na formação e organização das ligações dissulfetos (TIAN et al., 2006). A PDI foi primeiramente caracterizada baseada na sua capacidade de reenovelamento da enzima RNase A, uma enzima com quatro pontes dissulfeto (NOIVA, 1999). Esta enzima catalisa a reação de oxidação de dissulfeto no ambiente oxidativo do RE. Adicionalmente, a PDI esta presente em outros locais em tipos celulares diferentes. A PDI reduz pontes dissulfeto no citosol, endossomas e na membrana plasmática como consequência de ambientes mais redutores destes locais. Embora a PDI fosse inicialmente caracterizada como uma oxidoredutase, agora se sabe que ela está envolvida no enovelamento, montagem e na modificação pós-traducional de muitas proteínas (NOIVA, 1999; SEVIER, 2001). A atividade isomerase e também redutora de dissulfetos da PDI na superfície celular parece ser bem correlacionada com as propriedades conhecidas da proteína (TURANO, 2002). A PDI é uma proteína redox que tem atividade redutora quando na parte exofacial da membrana das células. Ela é responsável por 40% dos tióis totais da superfície celular nas plaquetas e tem papel na agregação plaquetária. A PDI também está envolvida na mudança de conformação de gpIIbIIIa para ocorrer a ligação ao fibrinogênio e nas trocas tiol/dissulfeto que ocorrem após a ligação do receptor. A PDI exerce influência redox sendo responsável pela conformação da integrina alfa-4 que possui tióis na superfície extracelular que auxiliam na adesão a fibronectina (SAHAF, 2004). Jiang, 1999 demonstrou que o estado redox da superfície de células de fibrosarcoma HT1080 está correlacionado com os níveis de PDI secretados. A PDI secretada controla o estado redox de tiós protéicos exofaciais existentes ou ligações dissulfeto reativas (JIANG et al., 1999). A PDI tem função importante no dobramento de proteínas secretadas (TIAN et al., 2006). A taxa de secreção da PDI varia de acordo com a atividade celular (LARAGIONE, 2003). Outras proteínas da família da PDI (Endoplasmic reticulum Protein (ERP5 e ERP57)) presentes no retículo endoplasmático, também têm função no meio extracelular em proteínas de superfície, em que estas estão envolvidas no remodelamento e reconhecimento dos receptores. O bloqueio de ERP5 em plaquetas humanas causa a quebra da função da integrina. Esta proteína associa-se fisicamente a integrina beta-3 durante a estimulação plaquetária (JORDAN, 2005). O grupo de Primakoff mostra que alguns membros da família PDI foram encontrados no acrossomo dos espermatozóides. Com uso de anticorpos específicos e substratos, sugeriram que a ERp57 tem papel importante na fusão do gameta. Os resultados mostraram que uma troca tiol/dissulfeto, é um

mecanismo que pode atuar na fusão do gameta com o óvulo, para produzir mudanças conformacionais em proteínas ativas no momento da fusão (ELLERMAN et al., 2006).

Logo a direção de vários processos celulares depende do estado redox intra e extracelulares. Portanto proteínas que modificam o estado redox de outras moléculas são moduladores críticos de fatores reguladores, como os envolvidos no controle da expressão gênica, sinalização celular e componentes da matriz extracelular.

## **2.2 Tiol/Dissulfeto oxidorredutases**

Muitas proteínas contêm ligações dissulfeto, que são necessárias para seu próprio dobramento, função e estabilidade. Em células eucarióticas as ligações dissulfeto formam-se geralmente no lúmen do retículo endoplasmático. In vitro essas ligações podem ocorrer espontaneamente usando um metal de transição ou flavina como cofator. In vivo, o principal mecanismo para a formação das ligações dissulfeto protéicas é a reação de troca tiol/dissulfeto de tióis livres, com uma espécie dissulfeto já ligada. Essas reações são catalisadas por enzimas celulares conhecidas como tiol/dissulfeto oxidorredutases (CHAKRAVARTHI et al., 2007).

### **2.2.1 ERV/ALR**

A família sulfidril oxidase ERV/ALR (essencial for respiration and vegetative growth/argumenter of liver regeneration), é caracterizada por uma seqüência bem conservada contendo o sitio ativo CXXC, um dissulfeto adicional CX<sub>16</sub>C, um conjunto de resíduos aromáticos que formam o sitio de ligação para o FAD (VITU et al., 2007). Este domínio conservado da família ERV/ALR consiste em aproximadamente 100 aa e contém o domínio CXXC, sugerindo que estas proteínas podem funcionar como tiol oxidorredutases (SENKEVICH et al., 2000). O domínio ERV/ALR sulfidril oxidase é um módulo adaptado para a catálise de ligações dissulfeto em várias organelas e eventos biológicos (LANGE et al., 2001; VITU et al., 2007). Esta ampla família inclui a proteína ERV1 de *Saccharomyces cerevisiae* que é necessária para a biogênese das mitocôndrias, e seus homólogos em outros organismos, a proteína de mamífero ALR e as quiescinas animais e de plantas. A função precisa dessas proteínas ainda não é bem conhecida (SENKEVICH et al., 2000; THORPE e COPPOCK, 2007; CHAKRAVARTHI et al., 2007; VITU et al., 2006).



### 2.2.2 Ero

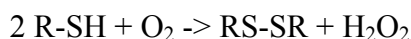
A tiol oxidorreductase Ero (Endoplasmic reticulum oxidase), gera ligações dissulfeto no retículo endoplasmático catalisando a transferência de elétrons de ditióis para o oxigênio molecular. O sítio ativo da Ero consiste de uma sequência de aminoácidos CXXC, com um FAD ligado como cofator. Um centro redox adicional, CX<sub>4</sub>C, acceptor de elétrons de outras proteínas transferindo-os para o dissulfeto CXXC (GROSS et al., 2005).

A Ero1p (endoplasmic reticulum oxidase 1p) é uma proteína essencial, residente no RE (retículo endoplasmático) com homólogos em vários eucariotos incluindo humanos e tripanossomos. A perda de sua função resulta em um acúmulo de proteínas cujo dobramento é dependente das ligações dissulfeto formadas nas proteínas desdobradas dentro do RE. Esta função sugere que a Ero1p desempenha um papel na manutenção de um ambiente oxidativo no RE (POLLARD et al., 1998; FRAND and KAISER, 1998, 1999).

A proteína humana homóloga da Ero1p, Ero1-L $\alpha$ , foi clonada e mostrou ser uma glicoproteína do lúmen do RE. Ero1-L $\alpha$  contém um domínio conservado CXXCXXC, que tem atividade redox porque é semelhante ao CXXC como da TRX dos eucariotos e procariotos. A conservação deste domínio é essencial para a manutenção do dobramento, estabilidade e estrutura da proteína é essencial (BENHAM et al., 2000).

### 2.2.3 QSOX

As sulfidril oxidases são enzimas que catalisam a formação de ligações dissulfeto através da redução de O<sub>2</sub>, com a formação paralela de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (THORPE, 2005) (eq1):



Foram descritas duas classes de sulfidril oxidases: as metaloproteínas, de Cu ou Fe (JANOLINO, 1975; CLARE, 1988; TAKAMORI, 1980) e as dependentes de flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (OSTROVIWSKI, 1980; DE LA MOTTE, 1987; HOOBER, 1996; 1999a; 1999b; 1999c; 1999d). As metaloenzimas sulfidril oxidases foram primeiramente purificadas e estudadas em 70 por Swaisgood e seus colegas. Duas famílias de sulfidril oxidases ligada a FAD foram descrita até agora: a família QSOX

(quiescina sulfidril oxidase) (HOOBER et al., 1999; THORPE et al., 2002) e a da ERV/ALR (essencial para respiração e o crescimento vegetativo/augmenter of liver regeneration) (LEE et al., 2002; LISOWSKY et al., 2001). As dependentes de FAD já foram descritas no trato genital masculino (OSTROVIWSKI, 1980; BENAYOUN, 2001), fungos (DE LA MOTTE, 1987), clara de ovo de galinha (HOOBER, 1996), endométrio de cobaia (MUSARD, 2001), epiderme de camundongos (MATSUBA, 2002) e cérebro de ratos (MAIRET-COELLO, 2002).

A primeira flavoproteína sulfidril oxidase foi purificada de vesícula seminal de rato em 1970, e mostrou oxidar tanto a glutathione reduzida como RNase reduzida (THORPE, 2002; THORPE E COPPOCK, 2007).

Estas sulfidril oxidases (abreviadas QSOX depois de quiescina Q6/sulfidril oxidase) contêm dois domínios reconhecíveis (Fig. 1): um N-terminal tiorredoxina/PDI e um domínio próximo ao C-terminal que é homólogo a Erv1p. Os membros da família Erv/Alr, têm uma notável lista de funções – desde a elaboração da matriz extracelular à maturação de poxvírus e desde fatores de crescimento em um tecido em regeneração ao envolvimento na montagem dos centros Fe/S citoplasmáticos (THORPE e COPPOCK, 2007).

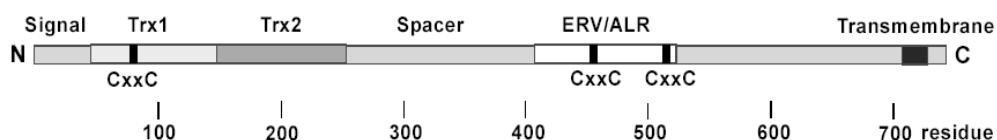


Figura 1: Estrutura dos domínios da QSOX de ave. As barras na vertical em preto mostram os três sítios redox ativos da enzima e o domínio transmembrana C-terminal.

Acredita-se que as proteínas Quiescina sulfidril oxidase QSOX estão envolvidas em funções celulares essenciais como no dobramento de proteínas (THORPE et al., 2002; THORPE e COPPOCK, 2007), elaboração da matriz extracelular, regulação do estado redox e o controle do ciclo celular (COPPOCK et al., 1999, 2000; MUSARD et al., 2001).

Recentemente, em humanos, um gene parálogo para QSOX (originalmente Qscn6 e localizado no locus 1q24; THORPE et al. 2002) foi identificado no locus 9q34 em células de neuroblastoma e foi nomeado QSOXN ou Qscn6LI (WITTEKE et al.

2003). A proteína QSOXN é altamente homóloga a membros da família QSOX e está relacionada com a sinalização apoptótica (WITTKE, 2003).

A cinética enzimática da sulfidril oxidase da clara de ovo tem sido bastante estudada como modelo para outras QSOX. Diversos são os substratos da QSOX de galinha, sendo o principal o DTT. Esta enzima catalisa a formação de pontes de dissulfeto dentro de um grande número de proteínas reduzidas incluindo peptídeos (insulina A e B), lisozima, ovoalbumina, proteína ligadora de riboflavina e RNase. O pI e o peso molecular de seus substratos são de pouca importância para a atividade da enzima. Mesmo cisteínas de proteínas citoplasmáticas desnaturadas são eficientemente oxidadas (THORPE, 2002; THORPE e COPPOCK, 2007). A QSOX é uma proteína secretada e também encontrada no retículo endoplasmático, apesar de não conter uma sequência sinal para que seja endereçada a este compartimento celular. Sua expressão é demonstrada em fibroblastos de pulmão de embriões humanos em quiescência reversível (COPPOCK, 1993; 2000). As enzimas de rato e boi parecem ter peso molecular de aproximadamente 65 kDa, e a enzima humana parece ter aproximadamente 90kDa (THORPE, 2002)

Assim, se a especificidade da QSOX for como a proteína da clara de ovo, a QSOX pode contribuir na formação de ligações dissulfeto em uma variedade de proteínas de membrana incluindo receptores e outras proteínas secretadas (HOOBER, 1999a; 1999b).

Altos níveis de expressão da QSOX de rato foram detectados por RT-PCR e Northern blot na vesícula seminal e no epidídimo, com níveis mais baixos em outros órgãos periféricos (BENAYOUN et al. 2001; MAIRET-COELLO et al. 2002). A rQSOX também é bem distribuída no cérebro. Dois transcritos de 2.8kb e 3.6kb que surgem do splicing alternativo, foram encontrados no cérebro, enquanto somente um mRNA de 2.8 Kb foi detectado em órgãos periféricos (MAIRET-COELLO et al. 2002). O mapeamento da proteína no cérebro de rato adulto por imunohistoquímica mostrou que ela é expressa especificamente por neurônios e diferentemente distribuída através do sistema nervoso central (MAIRET-COELLO et al. 2004). Particularmente, altos níveis de rQSOX foi encontrado em populações de neurônios que secretam peptídeos que contêm ligações dissulfeto como os neurônios do hipotálamo, que produzem ocitocina e vasopressina. Também é expressa em diversas populações celulares na adeno-hipofise (TURY et al. 2004).

O gene da QSOX é expresso em eucariotos e genes relacionados foram encontrados em protistas (*Trypanosoma brucei*), plantas (*Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*), e metazoários (vertebrados *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*) (THORPE, 2002). A presença de seu mRNA foi detectada em outros tecidos humanos, como placenta, fígado, coração, músculo esquelético, e também em células endoteliais de veia de cordão umbilical humano (HUVEC) (COPPOCK, 2000).

A presença dos domínios PDI/Trx e Erv1/Alr nas SOX dependentes de FAD fornece-lhes atributos interessantes, uma vez que PDI, Trx, Erv1, Alr e QSOX parecem estar estrutural e talvez funcionalmente relacionadas. Recentemente, a Erv1 foi descrita por ligar-se a FAD e possuir atividade sulfidril oxidase (LEE, 2000; THORPE et al., 2002; THORPE e COPPOCK, 2007). A proteína homóloga Erv1 em humanos é a Alr1, que parece ser secretada dos hepatócitos na forma ativa em resposta a danos no fígado (GANDHI, 1999) e também é uma FAD-sulfidril oxidase (LISOWNSKI, 2001). Interessantemente, a cooperação entre PDI purificada e a QSOX de clara de ovo foi recentemente demonstrada e mostrou-se importante para a oxidação de RNase reduzida e obtenção de seu dobramento correto *in vitro* (HOOBER, 1999a).

Assim, uma possível função da QSOX seria participar na regulação do equilíbrio tiol/dissulfeto na superfície celular e em proteínas de membrana com domínios extracelulares.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo deste trabalho é produzir e purificar a QSOX recombinante cataliticamente ativa.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Expressar a proteína QSOXm e QSOXh em sistema heterólogo recombinante de E.coli.
- Purificar a proteína QSOX através de cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC).
- Analisar sua atividade enzimática frente a alguns substratos como o DTT, cisteína, glutatona.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os reagentes DTT, DTNB, GSH, GSSG, cisteína foram obtidos da Sigma Co (St. Louis, MO); os vetores do sistema pET foram comprados da Novagen e as cepas bacterianas de *E. coli* foram doadas pelo IBMP (Instituto de Biologia Molecular do Paraná).

#### 3.1 Preparação de *E. coli* Rosetta Blue (DE3) quimiocompetentes

*E. coli* Rosetta Blue quimiocompetentes foram preparadas segundo o protocolo descrito por Sambrook et al. (2001) que consistiu nas seguintes etapas: uma colônia de *E. coli* foi inoculada em 0,5ml de meio LB (10g/l NaCl, 5g/l de extrato de levedura e 10g/l de peptona de carne) e cultivada por 16h a 37°C com agitação constante (pré-cultura). Os 0,5ml desta pré-cultura foram adicionados a 50ml de meio LB (cultura). A cultura foi incubada a 37°C sob agitação constante até atingir a absorbância 0,6 a 600nm. Após esse período a cultura foi resfriada no gelo por 10-15 minutos, e as células foram coletadas por centrifugação a 6.500 x g por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 25ml de CaCl<sub>2</sub> 100mM em tampão HEPES 10mM gelado e estéril. As células foram colocadas no gelo durante 20 minutos e foram novamente coletadas por centrifugação a 6.500 x g por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1ml de CaCl<sub>2</sub> 100mM; HEPES 10mM; glicerol 10% gelado e armazenadas a -70°C em alíquotas de 100μl em microtubos.

#### 3.2 Transformação das cepas de *E. coli* Rosetta Blue (DE3) quimiocompetentes

As células competentes (100μl) foram retiradas de freezer -70°C e descongeladas em gelo. Após o descongelamento, foi adicionado 1μl (aproximadamente 25ng) do plasmídio de interesse (pET28a-QSOXh), e as células foram incubadas no gelo por 30 minutos, e depois por 1 minuto a 42°C, para a introdução do DNA na célula. Após o choque térmico, foram adicionados às células 1000μl de meio LB sem antibiótico e esta cultura foi incubada a 37°C durante 1h para recuperação das células. Após este período as células foram plaqueadas em meio sólido (LB-Ágar, 17g/L Ágar) contendo 34μg/ml de cloranfenicol (resistência da Rosetta Blue (DE3)) e 40μg/ml de canamicina (o

plasmídeo pET28a possui um gene que codifica resistência a canamicina) e incubadas em estufa a 37°C durante a noite.

### **3.3 Purificação e obtenção do plasmídeo pET28a-QSOXh pela técnica de minipreparação de plasmídeo por lise alcalina**

Os plasmídeos foram purificados de acordo com o procedimento descrito por Sambrook et al. (2001). Uma colônia (DH5 $\alpha$ ) de uma placa de meio LB Agar, contendo o plasmídeo de interesse foi cultivada em 2ml de meio LB contendo o antibiótico apropriado (LB/canamicina/cloranfenicol) a 37°C por 16h com agitação. A cultura (1,5ml) foi coletada por centrifugação (13000rpm, 2 minutos) em uma microcentrifuga a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao sedimento bacteriano 100 $\mu$ l da Solução I de miniprep (50mM Glicose, 25mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH 8,0), em seguida foram adicionados 200 $\mu$ l da solução II (0,2M NaOH, 1% SDS) que foram homogeneizados por inversão, 150 $\mu$ l da Solução III (Acetato de Potássio 3M, pH 4.8) foi adicionado e misturado por inversão por aproximadamente 15 segundos. O material foi centrifugado por 5 minutos a 12000 x g a temperatura ambiente, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA foi extraído com um volume de fenol-clorofórmio 1:1 e precipitado com dois volumes de etanol absoluto gelado. O DNA foi coletado por centrifugação a 12000 x g por 10 minutos, levado com etanol 70%, seco e ressuspensionado em água deionizada autoclavada e livre de Dnases. Amostras dos clones foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8%.

#### **3.3.1 Eletroforese em gel de agarose 0,8%**

As amostras de DNA obtidas foram aplicadas em gel de agarose 0,8% (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Para aplicar as amostras no gel foram misturado 2 $\mu$ L de DNA; 2 $\mu$ L de Tampão 10X glicerol; 6 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O milliQ. Foram usado 3 $\mu$ L do marcador de peso molecular  $\lambda$ Hind. A separação no gel foi realizada em sistema HOEFER HE 33 – Mini Horizontal (Pharmacia Biotech), com corrida de 40 minutos, 100v e 80mA.

### **3.4 Clonagem do gene QSOX**

Os vetores pET28a e pET32a (Novagen) e o fragmento do gene para a proteína QSOX (obtida de cDNA de cultura de células musculares lisas humanas e cerebelo de camundongo), foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III para pET28a e *Hind*III e *Kpn*I para pET32a com o objetivo de criar extremidades coesivas que na presença de DNA ligase fossem capazes de se ligarem dando origem ao vetor contendo o gene para a proteína QSOX (as construções foram feitas por ZANATA, S. M e NAKAO, L. S, dados não publicados). O vetor pET possui o promotor do fago T7, confere resistência aos antibióticos ampicilina (pET32) e canamicina (pET28), e origina proteínas de fusão contendo etiqueta de 6 histidinas. Esta ultima característica permite a purificação da proteína de fusão por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (descrever sistema). O plasmídeo recombinante deve ser amplificado em uma linhagem de *E. coli* que contém a RNA polimerase de fago T7 para prevenir o escape de expressão da proteína recombinante e com baixa taxa de recombinação e endonucleases. Para realização de minipreparações das construções pET32aQSOXm e pET 28aQSOXh usou-se a cepa DH5 $\alpha$ . A expressão dos fragmentos da QSOX foi feita em uma linhagem que contém RNA polimerase do fago T7 sobre controle de um promotor indutível, tal como Lac UV-5, que é induzido na presença de IPTG. As cepas utilizadas para a expressão foram BL21(DE3) para QSOXm e Rosetta Blue (DE3) para QSOXh.

#### **3.4.1 Digestão do vetor pET28a contendo o inserto QSOXh**

O vetor pET28a contendo o inserto do gene da QSOXh foi digerido com enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III. Foi preparado um tubo de microcentrifuga para a digestão do vetor contendo 2 $\mu$ l do DNA; 6 $\mu$ l de água MilliQ e 1 $\mu$ l de tampão (NEB Buffer para *Bam*HI); 0,5 $\mu$ l da enzima *Bam*HI e 0,5 $\mu$ l da enzima *Hind*III. A digestão ocorreu por 2h à 37°C em banho maria. A amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8%.

#### **3.4.2 Eletroforese em gel de agarose 0,8%**

As amostras digeridas foram aplicadas em gel de agarose 0,8% (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Para aplicar as amostras no gel foi misturado mais 2 $\mu$ L de Tampão 10X glicerol ao produto da digestão (10 $\mu$ L). Foi usado 3 $\mu$ L do marcador de peso



molecular  $\lambda$ Hind. A separação no gel foi realizada em sistema HOEFER HE 33 – Mini Horizontal (Pharmacia Biotech), com corrida de 40 minutos, 100v e 80mA.

### **3.5 Mini-expressão da proteína**

A mini-expressão foi realizada para identificar as colônias com expressão protéica mais eficiente. Colônias recombinantes provenientes do plaqueamento (item 2.2) foram inoculadas em 2ml de meio LB/Canamicina/Cloranfenicol e cultivadas sob agitação durante 16h a 37°C (pré-inóculo). Um ml do pré-inóculo foram inoculados em tubos contendo 10ml de meio LB/canamicina/Cloranfenicol. As culturas foram incubadas a 37°C sob agitação até a absorbância de 0,4 – 0,6 a 600nm a 37°C. Após esse período foi adicionado IPTG na concentração final de 0,4mM. As culturas foram incubadas a 37°C por mais quatro horas. As bactérias foram coletadas (1ml) por centrifugação a 12000 x g por 5 minutos então ressuspendidas em tampão de amostra 2,5 vezes concentrado (90mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glicerol, 0,02% azul de bromofenol e 20µl/ml  $\beta$ -mercaptoetanol), submetidas a 10% SDS-PAGE e o gel foi corado com azul de Coomassie. Para confirmação da expressão da proteína foi feito um imunoenensaio de Western Blot com anticorpo anti-5HisTag (Invitrogen, Co); anti-PEP14 comercial  $\alpha$ -peptídeo 14 (antiPEP14). Este anticorpo reconhece a seqüência de aminoácidos da QSOX humana – resíduos 494-507 – EDPQFPKVQWPPRE e anti-QSOX mouse (produzido no laboratório). Resumidamente, coelhos foram imunizados com 130ug de proteína QSOX purificada presentes em uma emulsão e 100ug separados por eletroforese em gel de poliacrilamida, que foi macerado em PBS. As imunizações foram feitas em intervalos de 4 a 6 semanas. Amostras de soro foram coletadas através de punção cardíaca, 14 dias após a última imunização. Após a obtenção do soro hiperimune contra QSOX em coelho, purificou-se IgG por cromatografia de afinidade a proteína A-sepharose (proteína A sepharose CL-4b – Pharmacia Biotech Amersham). O volume restante da cultura foi coletado em único tubo de microcentrifuga através de sucessivas centrifugações.

#### **3.5.1 Teste de Solubilidade**

Ao pellet obtido da mini-expressão da proteína (item 2.5), foi acrescentado 1ml de tampão (Tris HCl 50mM; NaCl 500mM). Em seguida foram feitos 5 ciclos de 10

segundos em um sonificador de probe. Este lisado foi centrifugado a 10000 rpm a 4°C durante 20 minutos. O sobrenadante foi separado do pellet em outro tubo de microcentrifuga. Uma alíquota de 75µl deste sobrenadante mais 25µl de tampão de amostra 4X concentrado foram misturados. Volumes de 5µl, 10µl e 15µl foram aplicados em gel 10%. Ao pellet foram acrescentados 1ml de tampão (Tris HCl 50mM; NaCl 500mM) e ressuspendeu-se com pipeta. Uma alíquota de 75µl deste pellet ressuspendido mais 25µl de tampão de amostra 4X concentrado foram misturados. Foram aplicados 3µl desta amostra em gel 10% SDS-PAGE.

### **3.6 Mini-Purificação da proteína sob condições nativas**

Esta mini-purificação foi realizada em tubos de microcentrifuga sendo este protocolo utilizado como um teste inicial. Para purificar a proteína proveniente da mini-expressão, 1ml do sobrenadante do lisado bacteriano e 60µl de resina Ni-NTA agarose foram misturados e homogeneizados por inversão do tubo durante 15 segundos. Este tubo foi colocado durante 30 minutos em um agitador. Após este período o tubo foi centrifugado 1000 x g por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado. Foram feitos 3 ciclos de lavagem com 200µl de tampão de lavagem (Tris HCl 50mM pH 8.0; NaCl 500mM; 20mM imidazol) e 3 ciclos de eluição com 100µl de tampão de eluição (Tris HCl 50mM pH 8.0; NaCl 500mM; 300mM imidazol). Amostras da purificação foram aplicadas em gel SDS-PAGE 10%.

### **3.7 Expressão e purificação da proteína 6HIS-QSOXh em larga escala**

Clones com alta taxa de expressão da proteína foram expandidos em 500ml de meio de cultura líquido LB, com agitação, a 37°C. Quando as culturas atingiram a absorbância de 0,6 a 600nm, a expressão da proteína recombinante foi induzida com 0,4mM de IPTG, deixando-se então as células crescerem por mais quatro horas. Após este período, a suspensão celular foi centrifugada e as células utilizadas para a purificação.

As células foram ressuspendidas em solução de lise desnaturante (8M uréia, 100mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 10mM de Tris pH 8,0) e foram submetidas à pressão física em prensa de French, lisando a parede celular e membrana plasmática e dissociando os

corpos de inclusão. O extrato bacteriano obtido foi clareado por centrifugação (12000 x g por 20 minutos) e então submetido à cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC). As proteínas contendo a etiqueta de 6 histidinas ligaram à fase estacionária NTA-Ni-Agarose (Qiagen GmbH, Alemanha) através de ligação de coordenação do cátion  $\text{Ni}^{2+}$  imobilizado e das histidinas presentes na quimera protéica 6HIS-QSOXh. A resina foi transferida a uma coluna e lavada com tampão de lise desnaturante contendo 10mM de imidazol, para que proteínas fracamente ligadas se desligassem da coluna. As proteínas foram então eluídas com 250mM de imidazol em tampão de lise e armazenadas em alíquotas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A concentração de proteínas foi dosada em cada alíquota de acordo com o método de Bradford.

### **3.8 Expressão e purificação da proteína 6HIS-QSOXm em larga escala**

Para a produção de QSOXm foi utilizado uma alíquota de cepas de *E. coli* BL21 (DE3) já transformadas com o vetor de expressão pET32a com resistência à ampicilina, contendo o inserto da QSOXm (Ikegami, 2005). Essas alíquotas estavam estocadas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para isto, 10 $\mu\text{L}$  da alíquota de bactérias transformadas foi adicionada à 20mL de meio LB líquido contendo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina. Este pré-inóculo foi crescido à  $37^{\circ}\text{C}$  durante 16h. O inóculo maior foi preparado com 500mL de meio LB + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina + 10mL do pré-inóculo. Este inóculo cresceu à  $37^{\circ}\text{C}$ , com agitação constante de 220rpm até atingir a densidade óptica em 600nm igual a 0,7 usando como branco o meio LB. Quando a cultura atingiu a absorbância de 0,7 a 600nm, foi induzida a expressão utilizando 0,4mM de IPTG, deixando-se então as células crescerem por mais seis horas. O meio de cultura foi centrifugado a 10000rpm durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$  e as células utilizadas para a purificação.

As células foram ressuspensas em solução de lise desnaturante (6M uréia, 500mM de NaCl e 20mM de Tris pH 8,0, glicerol 10%) e foram submetidas à pressão física em prensa de French, lisando a parede celular e membrana plasmática e dissociando os corpos de inclusão. O extrato bacteriano obtido foi clareado por centrifugação (6500rpm por 15 minutos, à  $4^{\circ}\text{C}$ ), filtrado em 0.80 $\mu\text{m}$  e então submetido à cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC) (Coluna HiTrap Chelating HP, Amersham). A coluna Hi Trap foi lavada com  $\text{H}_2\text{O}$  milliq 10mL e em seguida foi carregada com  $\text{Ni}^{2+}$  (solução de  $\text{NiSO}_4$  0,1M, 5ml) e novamente lavada com 10ml de tampão de lise para equilibrar a resina. O extrato de bactérias (4ml) foi passado na

coluna para que as proteínas contendo a etiqueta de 6 histidinas ligassem à fase estacionária NTA-Ni-Agarose através de ligação de coordenação do cátion  $\text{Ni}^{2+}$  imobilizado e das histidinas presentes na químera protéica 6HIS-QSOXm. A coluna foi lavada com 6ml de tampão de ligação (20mM Tris HCl, 500mM NaCl, 6M uréia pH8.0) contendo 5, 30, 60, 125mM de imidazol, para que proteínas fracamente ligadas, por possuírem histidinas seqüenciais, se desligassem da coluna e diminuíssem a contaminação da proteína de interesse. As proteínas foram então eluídas com 500mM de imidazol em tampão de ligação pH5.9 e armazenadas em alíquotas a -20°C.

### **3.9 Análise da purificação**

Amostras da proteína purificada foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante e redutor (SDS-PAGE), transferidas para membrana de nitrocelulose e submetidas à reação de imunoblot com anticorpo anti-5His (Invitrogen, Co.).

### **3.10 Diálise da proteína purificada em uréia**

A proteína purificada estava em tampão contendo 8M de uréia sendo necessária a remoção do agente caotrópico por diálise. Foram feitas três trocas de dois litros (seis litros no total) de tampão PBS pH 7,4 (137mM NaCl; 2,07mM KCl; 10mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ ; 1,8mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) a 4°C, com duração de 2h, 16h e mais 2h. O tampão de diálise foi mantido em agitação magnética durante o período de renaturação das proteínas. A concentração da proteína após a diálise foi dosada pelo método de Bradford (1976).

### **3.11 Separação eletroforética por SDS-PAGE**

A proteína recombinante purificada foi submetida à eletroforese SDS-PAGE 10% (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). A proteína utilizada no experimento foi diluída em tampão de amostra redutor na proporção de 3:1, sendo que esta mistura amostra/tampão foi fervida durante cinco minutos. A separação eletroforética foi realizada em sistema Mini Protean3 (Bio Rad) com corrente de 10mA até a entrada da proteína no gel de separação, e em seguida a corrente foi elevada para 25mA, sendo que essa corrente permanecerá constante até a saída da frente de migração do gel.

### **3.12 Imunoensaio de Western Blotting**

As amostras separadas por SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose (0,45µm – Amersham Biosciences, USA) durante 16h sob voltagem constante de 25V. As membranas foram bloqueadas durante duas horas com TBST (129mM de NaCl, 20mM de Tris e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado liofilizado (Molico, Nestlé). A detecção da proteína recombinante foi feita com anticorpos primário (anti-5His 1:5000, anti-pep14 1:2000, anti-QSOXm 1:2000) diluídos em tampão de bloqueio. As membranas ficaram incubando com o anticorpo primário durante 16h a 4°C. Após este tempo, foi feita a lavagem da membrana em ciclos de cinco vezes por cinco minutos com TBST e em seguida, foram adicionados anticorpos secundários (anti-imunoglobulina de camundongo na diluição de 1:10000, de cabra e de coelho) conjugados a peroxidase durante uma hora à temperatura ambiente. A membrana foi submetida a um novo ciclo de lavagem, e então incubada com o substrato adequado para a reação quimioluminescente (Amersham Pharmacia). Um auto-radiograma (Kodak) foi exposto à membrana em diversos tempos até a visualização adequada do antígeno.

### **3.13 Preparação de líquido seminal de rato para obtenção de QSOX**

O líquido seminal coletado a partir da vesícula seminal de um rato adulto foi homogenizado em tampão de lise gelado (50mM Tris HCl pH 7,4; 0,2% de deoxicolato; 0,5% de Triton X-100; 0,5% de NP-40 com inibidores de proteases Roche). O extrato, com aspecto floculado foi centrifugado a 12000 x g por 30s e o sobrenadante recuperado teve a concentração protéica dosada por Bradford (1976) e armazenado à -20°C (BENAYOUN et al., 2001).

### **3.14 Preparação de extrato de clara de ovo para obtenção de QSOX**

A clara de um ovo de galinha foi diluída com 2 volumes de tampão fosfato 50mM, 0,3mM EDTA, pH 7.5 a 4°C e com o auxílio de um potter a mistura foi homogeneizada (HOOBER et al. 1996). Após, foi centrifugado a 9000 x g durante 10 minutos a 4°C, para separar o material suspenso. O sobrenadante foi aliqotado em

tubos de microcentrífuga e estocado em freezer -20°C. Uma alíquota foi utilizada para a dosagem de proteínas pelo método de Bradford.

### **3.15 Medida da atividade enzimática**

#### **3.15.1 Método do Ácido Homovanílico**

A determinação da atividade enzimática da QSOX foi monitorada pela formação do peróxido de hidrogênio através de uma reação acoplada, onde o peróxido de hidrogênio e a peroxidase de raiz forte (HRP) oxidam o ácido homovanílico a um produto fluorescente (RAJE, 2002). Para isso, o experimento foi realizado em tampão de fosfato de potássio 50mM, pH 7,5 contendo EDTA 0,3mM, ácido homovanílico (1mM), peroxidase de raiz forte (1,4μM) e o DTT (300μM) foi inicialmente utilizado como substrato. O fluorímetro foi utilizado com  $\lambda_{ex}$  320nm e  $\lambda_{em}$  420nm.

#### **3.15.2 Método do DTNB**

A determinação da atividade enzimática da QSOX foi monitorada pela oxidação de 2mM de DTT em tampão Tris-HCl pH 8.0 100mM. Para isto, um tubo de reação foi preparado contendo 2mM DTT em tampão Tris-HCl 100mM pH 8.0. A este tubo, foram adicionados 0,006μg/μL da proteína QSOX recombinante. Em tempos estabelecidos (1, 5, 10, 15 e 30 min), foram retiradas alíquotas de 10uL da reação, em cada tempo, e reagidos com 1mL de solução 0,5mM de DTNB em Tris-HCl pH8.0 100mM, homogenizados e a absorbância medida em 412nm contra branco de solução de DTNB 0,5mM (BENAYOUN, 2001).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

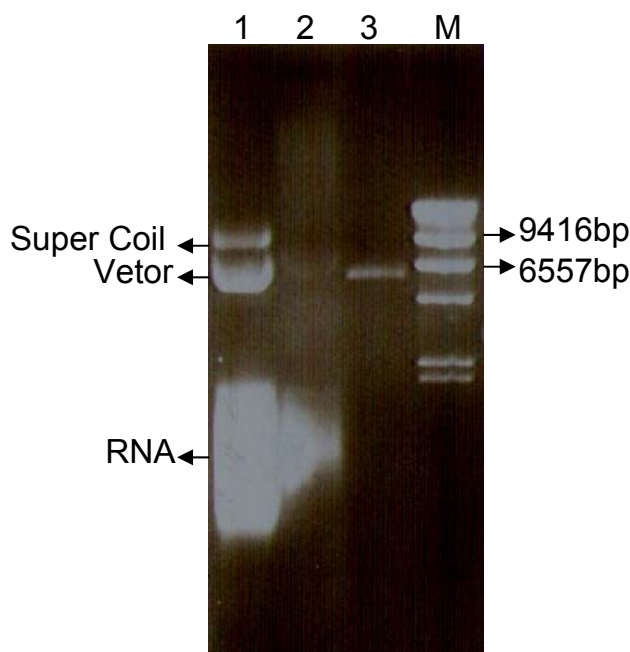
Para os estudos realizados com QSOXh, fez-se necessário a construção de um vetor contendo o inserto do gene que codifica a proteína de interesse. O vetor obtido com o fragmento clonado da proteína QSOXh, foi construído através da clonagem do gene de células musculares lisas humanas,. Da cultura primária destas células foi isolado o RNA total para que fosse feita a reação para produção do cDNA. Para isto, foi clonado o gene da QSOX praticamente inteiro (nt 268 a nt 1704, accession number NM\_002826.2), utilizando primers com sítios de restrição para as enzimas *BamHI* e *HindIII*. O fragmento amplificado de 1437bp, foi ligado em um vetor de expressão vetor pET28a+ (Novagen Co) nos sítios apropriados. Após ligação, o vetor com o inserto foi seqüenciado para verificar a identidade do fragmento clonado.

Para a produção de QSOXm, foi empregado o plasmídeo pET32a (Novagen) contendo o inserto de QSOX (nt +123 a +1646 da sequência NM\_023268 obtida de cerebelo de camundongo), e portanto possui 1533bp. As construções que continham o inserto foram seqüenciadas com o uso dos mesmos primers para amplificar o cDNA de QSOXm.

A partir destes vetores contendo os insertos da QSOXh e QSOXm, foi então possível produzir, purificar e estudar algumas características bioquímicas de QSOX de mamífero.

### 4.1 Eletroforese em gel de agarose do vetor pET28a-QSOXh

Amostras das minipreps foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% para averiguação de suas massas moleculares. As amostras foram preparadas de acordo com os seguintes volumes: 2ul do vetor; 2ul de tampão 10X glicerol; 6ul de água MilliQ. Os 10ul totais foram aplicados em gel de agarose e analisados. As amostras 1 e 2 preparadas com a técnica da lise alcalina mostram uma banda de RNA, pois as mesmas não foram tratadas com RNase. A banda superior a do vetor mais o inserto (6806bp) representa o plasmídeo super-enovelado (supercoiled). Diferentemente as preparações realizadas com kit mostram somente uma banda única do vetor pET28a (5369bp) com o inserto QSOXh (1437bp).



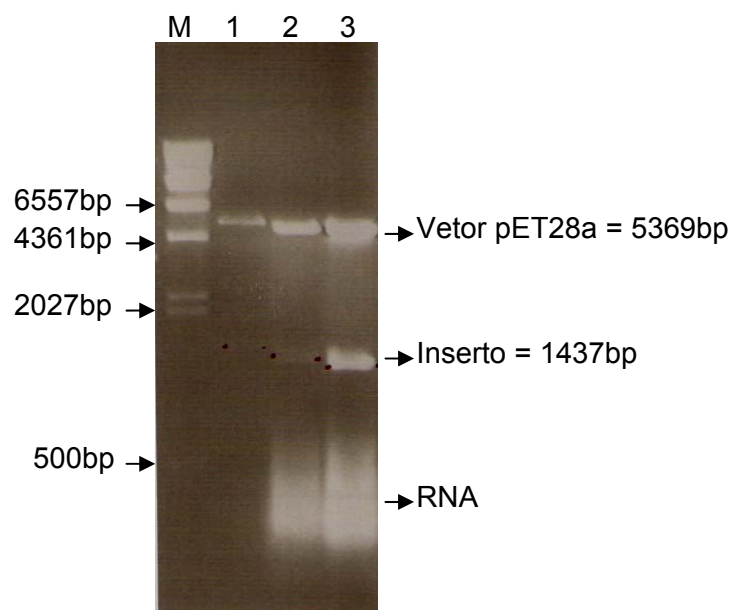
**Figura 1:** Vetor pET28a-QSOXh. Os clones das minipreparações obtidas pela técnica da lise alcalina e através do KIT QIAPREP da QIAGEN foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% para separação e purificação dos mesmos. As canaletas 1 e 2, amostras de minipreparações pela técnica da lise alcalina. Canaleta 3, amostras de uma minipreparação pelo Kit QIAPREP. M – marcador molecular  $\lambda$ /HindIII.

#### 4.2.1 Digestão do vetor pET28a contendo o inserto QSOXh

O vetor pET28a contendo o inserto da QSOXh foi submetido à digestão com as enzimas de restrição *BamHI* e *HindIII*. O produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8%. Conforme mostra a figura 2, a minipreparação purificada com kit da Qiagen não continha níveis detectáveis do inserto (canaleta 1), assim como uma das minipreparações com a técnica de lise alcalina (canaleta 2). Na outra minipreparação (canaleta 3), duas bandas são evidenciadas, uma do vetor linearizado (aberto) e outra do inserto. Neste caso podemos observar maior rendimento na minipreparação in house, apesar desta conter mais impurezas (banda de RNA), quando comparamos com a técnica do kit Qiagen.

As construções foram confirmadas através da reação de sequenciamento automático e comparação com o programa BLAST ([www.ncbi.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/)).





**Figura 2:** Digestão do vetor pET28a-QSOXh. O produto da digestão do vetor pET28a-QSOXh com *Bam*HI e *Hind*III foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8%. M – marcador molecular  $\lambda$ /HindIII. Canaleta 1, digestão da minipreparação com Kit QIAPREP; canaleta 2 e 3, digestão das minipreparações pela técnica da lise alcalina.

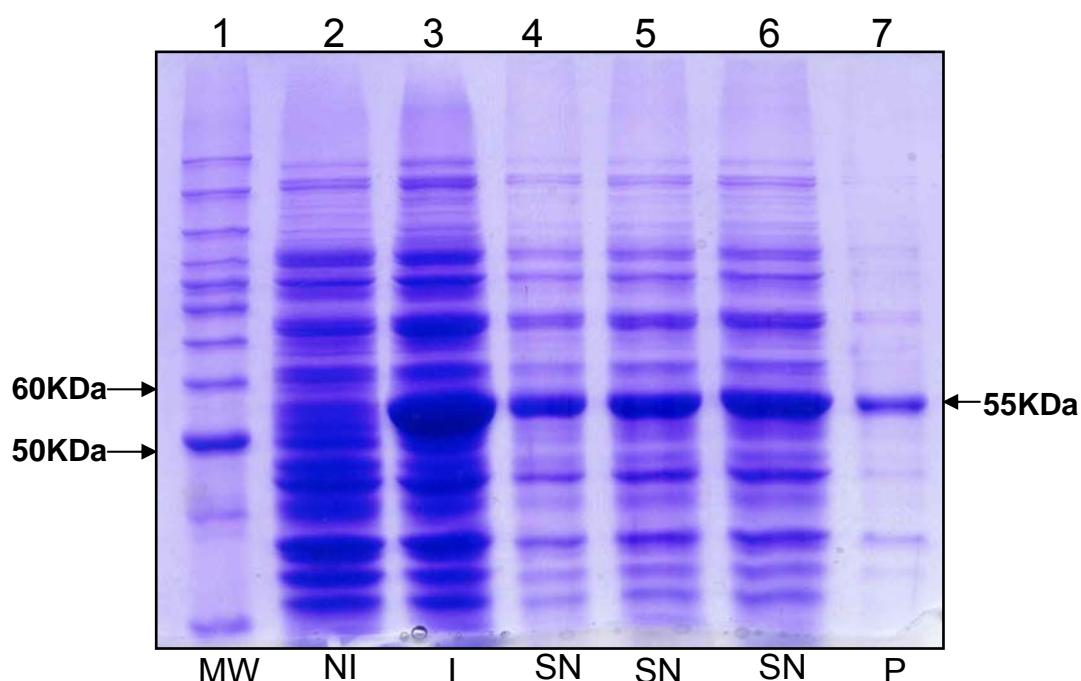
Com base nos resultados apresentados pode-se concluir que a digestão dos vetores foi eficiente liberando o fragmento de DNA correspondente a massa molecular esperada para a sequência de QSOXh obtida de cDNA de células musculares lisas humanas. A partir desta confirmação foi possível testar o protocolo para a expressão e purificação da proteína recombinante  $\delta$ His-QSOXh.

#### 4.3 Expressão do cDNA QSOXh em Rosetta Blue (DE3)

O DNA codificado para a QSOXh (accession number: gi 13325074 ref. NM\_002826.2; Homo sapiens quiescin Q6 (QSCN6) mRNA) foi inserido no sítio de policlonagem do vetor de expressão pET28a+. Este vetor de expressão possibilita a adição de uma cauda de 6 resíduos de histidina à proteína de interesse. Isto facilita a análise da expressão, juntamente com a purificação da proteína. Este plasmídeo recombinante pET28a-6HisQSOXh foi usado para transformar células de *E. coli* Rosetta Blue (DE3). Outros tipos de células foram usados, como por exemplo BL21 (DE3), BL21 (DE3) P Lys S, XL1 Blue, com as quais não conseguimos obter o mesmo sucesso na expressão. Um aumento significativo do nível de expressão de uma proteína com 55kDa foi observado 4 horas depois da adição de 0,4mM de IPTG na cultura de células transformadas com o vetor de expressão pET28aQSOXh com crescimento em

meio LB, como indicado no gel SDS-PAGE 10% (Fig.3). Não foi detectado nível de expressão desta proteína em extrato da cultura não induzida com IPTG (Fig.3). A proteína humana, considerando o sítio de policlonagem e o tamanho do inserto, tem aproximadamente um tamanho de 55kDa. Alíquotas do cultivo bacteriano não induzido e induzido que aparecem na figura 3 confirmam o padrão de bandas da expressão de QSOX recombinante humana.

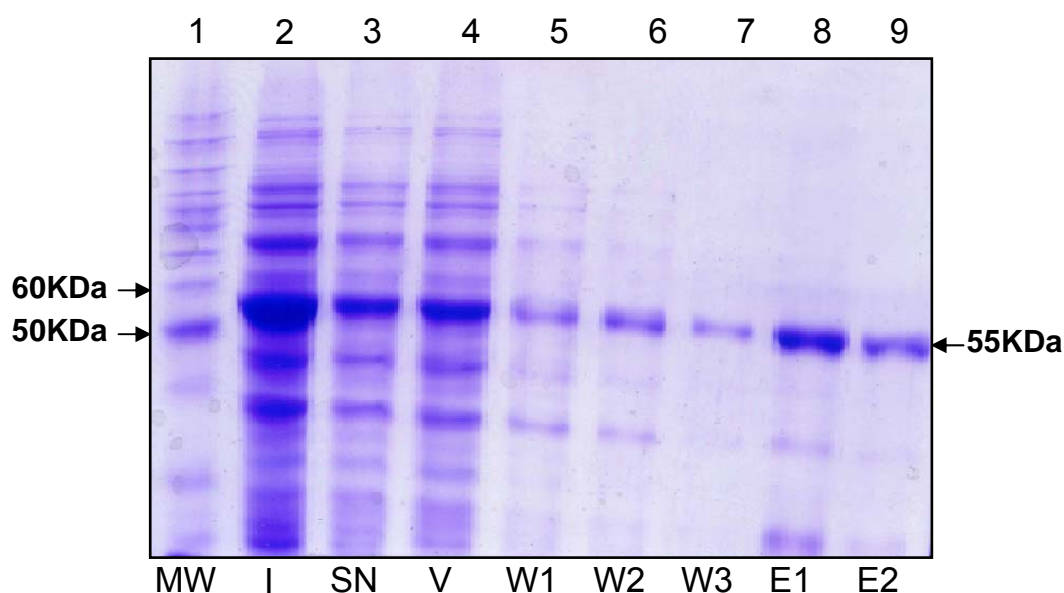
Para diferenciar a localização e a solubilidade da proteína expressa pelas células de *E. coli*, um extrato total da cultura de 10ml foi analisado. Depois da lise celular com tampão específico, foi demonstrado que a proteína superexpressa está presente tanto em corpos de inclusão (insolúvel) como no citoplasma das células (solúvel) de *E. coli* Rosetta Blue (DE3) (Fig.3).



**Figura 3:** SDS-PAGE da expressão da QSOXh. A QSOXh-6HIS foi expressa em *E. coli* Rosetta Blue (DE3) como descrito nos materiais e métodos. Amostras foram submetidas à SDS-PAGE 10% (p/v) poliacrilamida gel e foram visualizadas por corante Coomassie-Blue. Canaleta 1 foi aplicado 5ul do marcador de peso molecular (MW). As canaletas 2 e 3 demonstram a diferença de expressão na cultura não induzida (NI) e induzida (I) com 0,4mM de IPTG concentração final. Nas canaletas 4, 5 e 6 diferentes volumes do sobrenadante do extrato celular (SN) 5, 10 e 15ul respectivamente, foram aplicados no gel, mostrando a proteína presente no citoplasma celular (fração solúvel). Na canaleta 7 foi aplicado 3ul do pellet (P), proteína presente em corpos de inclusão (fração insolúvel).

#### 4.4 Purificação da proteína QSOXh-6HIS

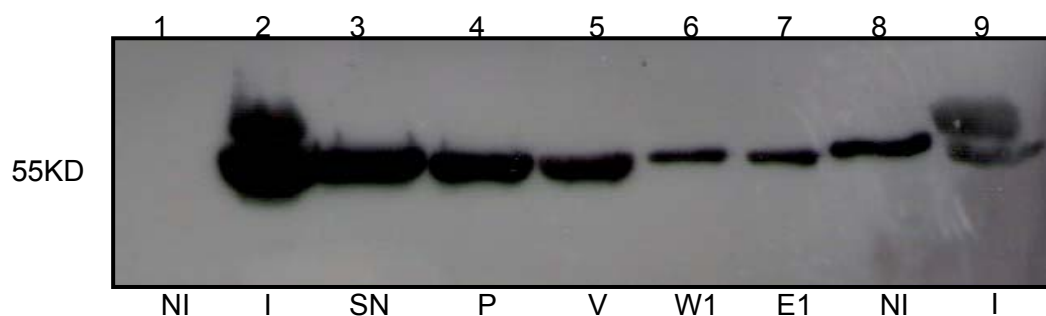
No vetor de expressão pET28a, a fusão do gene QSOX humano com uma cauda de 6 resíduos de histidina permite que processos de purificação sejam otimizados. Na purificação da proteína, foi utilizada uma resina de Ni-NTA Agarose (QIAGEN). A cauda hexa-histidina que está fusionada com a proteína QSOX humana se liga ao níquel que consequentemente está ligado a resina. Este experimento foi realizado sob condições nativas. Outros protocolos incluem purificações em condições desnaturantes sendo necessário um refolding posterior da proteína. Nosso objetivo era apenas testar um dos métodos de purificação, neste caso em condições nativas para avaliar a eficiência da expressão e se poderíamos realizar expressões e purificações em larga escala em experimentos futuros. Para este experimento foi utilizado o sobrenadante do lisado celular, descrito no item 3.3, onde estavam presentes as proteínas solúveis demonstrado na figura 3. A proteína recombinante QSOXh-6His foi purificada das células de *E. coli* Rosetta Blue (DE3) por ligação a resina Ni-NTA Agarose durante 30 minutos. As proteínas que não se ligaram a resina durante este período são demonstradas no gel (VOID, Fig. 4). As lavagens são realizadas com baixas concentrações de imidazol no tampão para prevenir a ligação de contaminantes à resina (background). A possibilidade das proteínas não marcadas com a cauda de 6 histidinas interagirem com a resina de Ni-NTA é geralmente maior em condições nativas do que em condições desnaturantes. Isto se reflete na alta concentração de proteínas que aparecem nas amostras das lavagens (canaletas 5, 6 e 7, fig. 4). Para a eluição da proteína a concentração de imidazol foi aumentada para 300mM fazendo com que as 6 histidinas se desliguem dos sítios de ligação na resina de Ni-NTA. A proteína purificada corresponde em tamanho ao seu peso molecular previsto em SDS-PAGE 10%, de 55kDa (Fig. 2). Este experimento foi realizado para testar a possibilidade da purificação da proteína expressa. Sendo assim, não foi considerado o rendimento desta purificação.



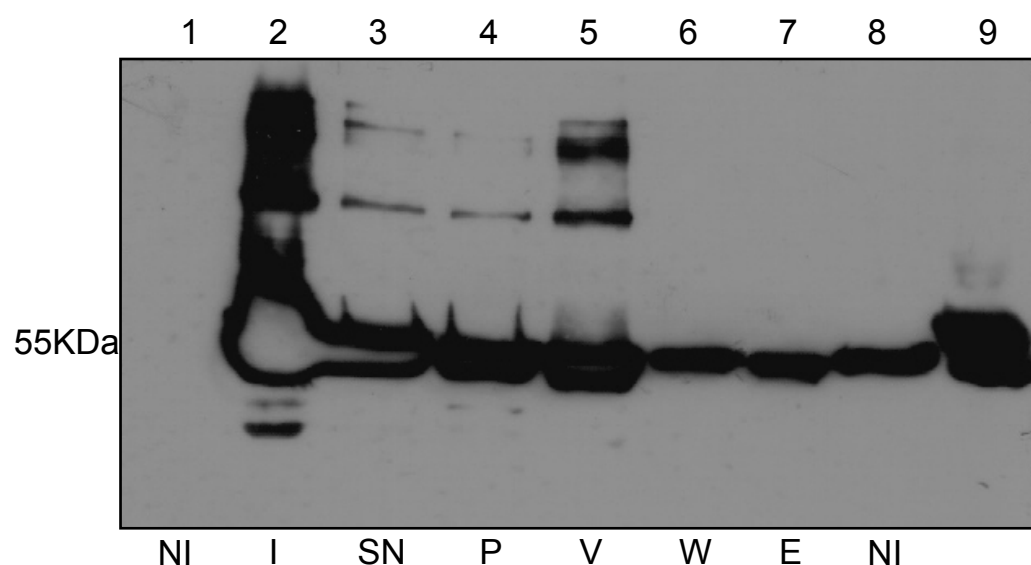
**Figura 4:** SDS-PAGE da purificação da QSOXh. A QSOXh-6HIS foi purificada em resina Ni-NTA Agarose. Amostras foram submetidas à SDS-PAGE 10% (p/v) poliacrilamida gel e foram visualizadas por corante Coomassie-Blue. Na canaleta 1 foi aplicado 5ul do marcador de peso molecular (MW). Na canaleta 2, 20µl de amostra da cultura induzida (I). Na canaleta 3 (SN), 20µl sobrenadante do lisado contendo proteínas solúveis. Na canaleta 4, 20µl de proteínas que não se ligaram a resina durante os 30 minutos de incubação (Void). Nas canaletas 5, 6 e 7, 20µl amostras das lavagens com 30mM imidazol (Wash). Nas canaletas 8 e 9, 20 µL das amostras das eluições da proteína com 300mM imidazol.

#### 4.5 Ensaios de Western Blot

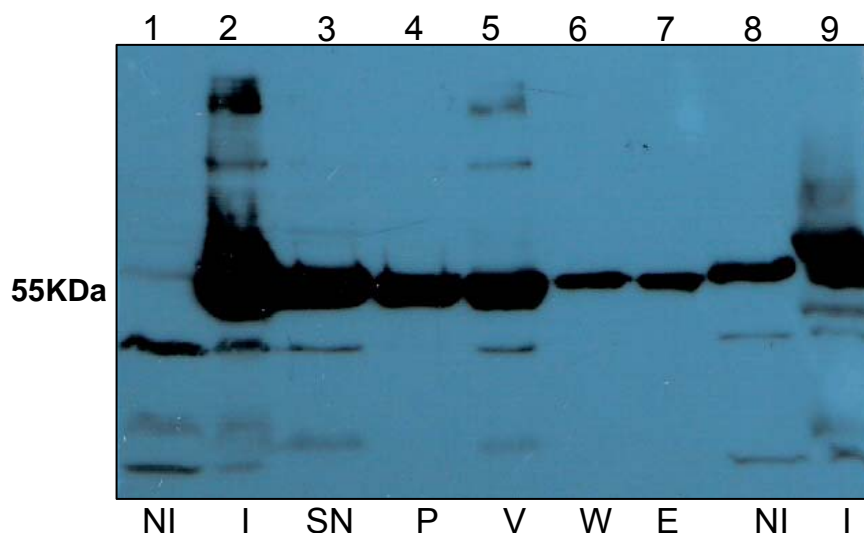
Para uma identificação inequívoca da proteína recombinante QSOX superexpressa, ensaios de western blot foram realizados usando diferentes anticorpos. As figuras 5, 6 e 7 mostram reações com anticorpo monoclonal anti 5HIS-Tag (figura 5), que deixa claro se tratar da proteína recombinante já que o anticorpo monoclonal utilizado não reconhece proteína de *E. coli*. Também confirmam a presença da QSOX os ensaios feitos com anti-pep14 (Fig 6) e anti QSOX recombinante de camundongo (Ikegami, 2005), (Fig. 7) realizados na mesma membrana após sucessivos processos de *stripping*.



**Figura 5:** Análise por western blot da QSOXh recombinante usando anticorpo contra 5HisTag. Canaleta 1, cultura não induzida (NI). Canaleta 2 cultura induzida (I). Canaleta 3, sobrenadante do lisado celular (SN). Canaleta 4, pellet (P). Canaleta 5, void (V). Canaleta 6, lavado 1 da purificação (W1). Canaleta 7, eluído 1 (E1). Canaleta 8 e 9, cultura não induzida e induzida de uma expressão em larga escala (NI) e (I), respectivamente.



**Figura 6:** Análise por western blot da QSOXh recombinante usando anticorpo contra PEP14 (peptídeo humano). Canaleta 1, cultura não induzida (NI). Canaleta 2, cultura induzida. Canaleta 3, sobrenadante do lisado celular. Canaleta 4, pellet. Canaleta 5, void. Canaleta 6, lavado 1 da purificação. Canaleta 7, eluído 1. Canaleta 8 e 9, cultura não induzida e induzida de uma expressão em larga escala, respectivamente.



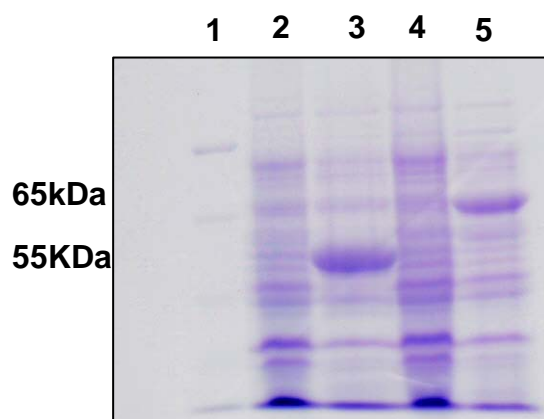
**Figura 7:** Expressão e purificação da QSOXh recombinante. Análise por western blot da QSOXh recombinante usando anticorpo contra QSOXm produzido no laboratório. Canaleta 1, cultura não induzida (NI). Canaleta 2, cultura induzida. Canaleta 3, sobrenadante do lisado celular. Canaleta 4, pellet. Canaleta 5, void. Canaleta 6, lavado 1 da purificação. Canaleta 7, eluido 1. Canaleta 8 e 9, cultura não induzida e induzida de uma expressão em larga escala, respectivamente.

Os resultados de western blot confirmam a presença da proteína QSOX nos diferentes processos de sua produção. Em todas as reações foi utilizado anticorpo secundário acoplado a HRP e revelado com kit de quimiluminescência (Pierce). Os anticorpos primários usados para estes ensaios foram selecionados através das características usadas no processo de expressão e da própria proteína. O anticorpo comercial anti-5His-Tag reconhece a cauda de 6 resíduos de Histidina codificada no vetor de expressão pET28a. Essa cauda é fusionada a proteína durante o processo de transcrição, pela RNA polimerase da bactéria, do gene inserido no vetor. O anticorpo comercial  $\alpha$ -peptídeo 14 (anti-pep14). Este anticorpo reconhece a seqüência de aminoácidos da QSOXh – resíduos 494-507 – EDPQFPKVQWPPRE (HOOBER, 1999). O anticorpo produzido em nosso laboratório contra proteína QSOX recombinante de camundongo (QSOXm), também reconhece a proteína de humano. O padrão de bandas obtidas após a incubação com este anticorpo é o mesmo para o anticorpo AntiPEP14. Também visualizam-se várias bandas (Figs. 5, 6 e 7), as quais podem ser devido: (i) à degradação protéica ou a formação de complexos protéicos, provavelmente devido ao processo de purificação, já que as células foram submetidas a pressão mecânica. Pode ter ocorrido possível associação entre a proteína recombinante e outras proteínas do extrato celular que estariam migrando junto com a  $\delta$ His-QSOXh; (ii)

a interações químicas entre aminoácidos da própria proteína  $\text{His-QSOXh}$  com proteínas bacterianas, aumentando assim sua massa molecular, (iii) e finalmente a processamento por alguma endonuclease bacteriana levando à clivagem da proteína em duas subunidades de massas moleculares diferentes, uma com aproximadamente 55kDa e outra com peso superior. Outra hipótese seria a presença de stop códons presentes no inserto. As bandas mais evidentes nas canaletas 8 e 9 (cultura não induzida e induzida) mostram que ocorreu vazamento na expressão, mesmo antes da adição de IPTG no meio de cultura, fato este bem documentado na literatura (JOB et al., 2002; HAN et al., 2000). Sendo assim, mesmo em condições adequadas de trabalho, temperatura, reagentes refrigerados, uso de agentes inibidores de proteases, é quase que inevitável a presença de degradação da proteína.

#### 4.6 Transformação da cepa BL21 com a construção pET32a-QSOXm, expressão e purificação da proteína recombinante

De forma semelhante ao descrito para QSOXh (item 3.3), a proteína QSOX de camundongo foi expressa na cepa bacteriana BL21. Aliquotas do cultivo bacteriano não induzido e induzido foram submetidas à eletroforese em gel 10% SDS-PAGE, e o padrão de bandas obtido confirmou a expressão de QSOX recombinante murina. Diferentemente da proteína humana que apresenta tamanho de aproximadamente 55kDa, a proteína murina apresenta tamanho de 65kDa, considerando que o inserto é maior (1533pb).

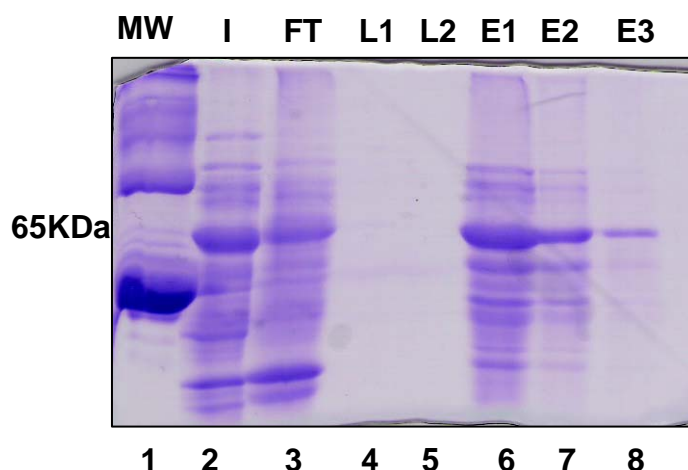


**Figura 8:** Amostras do cultivo bacteriano Roseta Blue (QSOXh) e BL21 (QSOXm), submetidas à eletroforese em gel 10% SDS-PAGE e coradas com o corante Azul de Comassie. Pode-se observar o aparecimento de uma banda intensa de 65KDa (canaleta 5) correspondente a 20ul de amostra do cultivo induzido, confirmando a expressão de



QSOXm recombinante. Canaleta 1 peso molecular 5ul; canaleta 2 cultivo não induzido de QSOXh 20ul, canaleta 3 cultivo induzido de QSOXh 20ul, canaleta 4 cultivo não induzido de QSOXm 20ul.

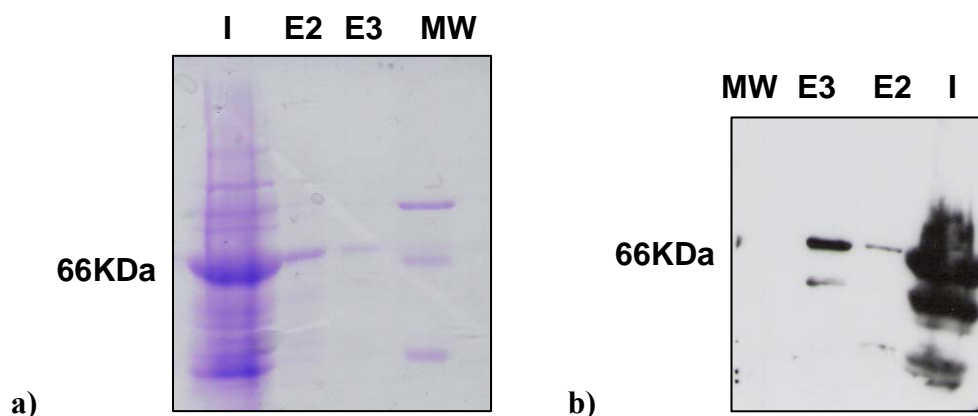
Na purificação da QSOXm utilizamos uma coluna já empacotada de 1ml (Hi-Trap Chelating HP – Amersham). A purificação foi realizada em condições desnaturantes (6M uréia), já que a proteína murina também se encontra em corpos de inclusão (resultado não mostrado). Semelhante a purificação de QSOXh (item 3.4), a resina foi equilibrada com tampão de lise e o extrato bacteriano foi passado através da coluna diversas vezes. Em seguida, a coluna foi lavada e as proteínas ligadas à resina foram eluídas aumentando-se a concentração de imidazol no tampão para 500 mM (ver item 2.8 material e métodos). Foram separadas alíquotas das diferentes etapas de purificação e submetidas à eletroforese em gel 10% SDS-PAGE (Fig. 9).



**Figura 9:** SDS-PAGE da purificação da QSOXm. A QSOXm-6HIS foi purificada em resina Ni-NTA Agarose (Amersham). Amostras foram submetidas à SDS-PAGE 10% (p/v) poliacrilamida gel e foram visualizadas por corante Coomassie-Blue. Na canaleta 1 foi aplicado 5ul do marcador de peso molecular (MW). Na canaleta 2, 20ul de amostra da cultura induzida (I). Na canaleta 3 (FT), 20ul do flow through. Nas canaletas 4 e 5, 20ul amostras das lavagens com 30mM imidazol. Nas canaletas 6, 7 e 8, 20 µL das amostras das eluições da proteína com 500mM imidazol.

Amostras da proteína purificada foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE e imobilizadas em membrana de nitrocelulose. Incubando-se a membrana com anticorpo anti-5HIS-Tag e revelando com substrato adequado, observa-se o aparecimento de bandas iguais a 65KDa da QSOXm recombinante (Fig. 10).





**Figura 10.** Padrão de bandas obtido para a proteína QSOXm recombinante purificada. Frações oriundas da purificação de QSOXm foram submetidas à SDS-PAGE 10%. Parte do gel foi corada com azul de Coomassie (a) e parte foi transferido para membrana de nitrocelulose (b) e esta foi reagida com anticorpo comercial anti 5His-Tag. I - 20ul da cultura induzida; E2 - 20ul da segunda alíquota eluída; E3 - 20ul da terceira alíquota eluída; MW - 5 ul do padrão de massa molecular.

Como para a proteína humana, a reação com o anticorpo anti-5HIS-TAG para proteína de camundongo, confirma que a proteína purificada é uma proteína com etiqueta de histidinas. O gel corado com azul de Coomassie mostra que parece não ocorrer a purificação de proteínas contaminantes juntamente à QSOXm recombinante. Em contrapartida, a reação de western blot com o anticorpo específico para a cauda de histidinas (anti-5HIS), mostra a presença de uma banda com massa inferior a 65KDa. Essa banda inferior pode ser produto de degradação protéica durante o processo de purificação como discutido anteriormente para proteína humana.

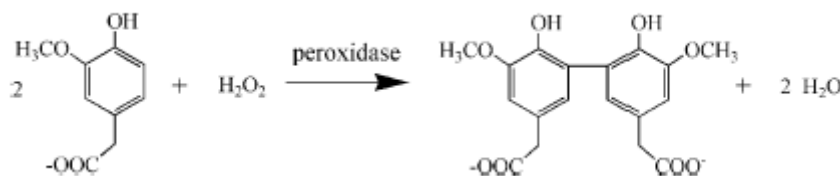
#### 4.6 Ensaios de Atividade Enzimática

Estes experimentos foram realizados com a intenção de verificar se a enzima QSOX recombinante de camundongo apresentava atividade sulfidril oxidase. Para isto, foram usados dois modelos experimentais descritos no item 2.15 material e métodos.

##### 4.6.1 Medida da atividade enzimática da QSOXrec pelo método do ácido homovanílico

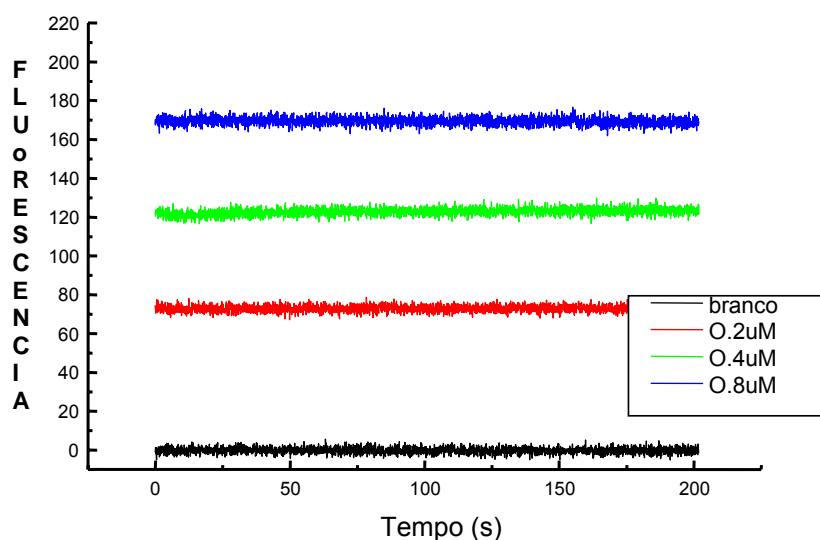
Para verificar se a atividade enzimática da QSOXrec produzida e purificada foi realizado um ensaio que monitora continuamente a formação de peróxido de hidrogênio formado pela sulfidril oxidase, usando HRP como mediador para formação de um

composto fluorescente (RAJE et al., 2002). A HRP catalisa a reação de oxidação do ácido homovanílico pelo peróxido de hidrogênio. O produto desta reação é a formação de um dímero do ácido homovanílico fluorescente (Esquema 1).



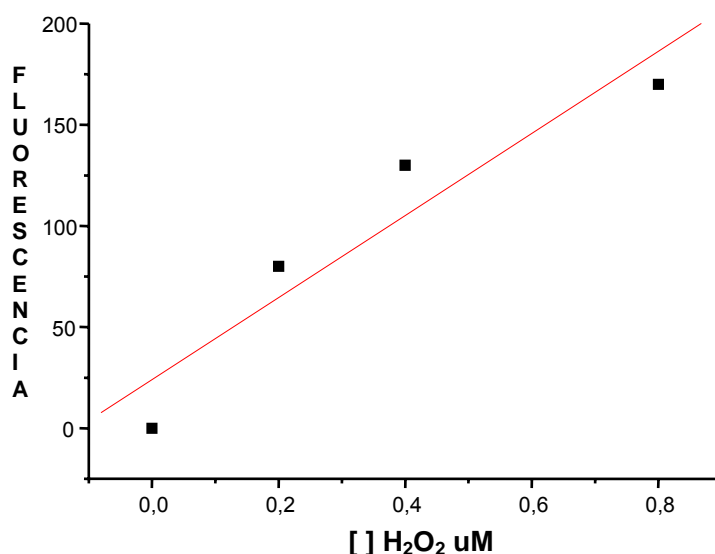
**Esquema 1:** reação de oxidação do ácido homovanílico por HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> usada para detectar a formação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A HRP ativada pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por sua vez gerado pela sulfidril oxidase, reage com o HVA gerando um composto fluorógeno (RAJE et al., 2002).

Primeiramente foi feita uma curva padrão com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio para padronização das medidas de fluorescência obtidas no espectrofluorímetro Fig. 11A e 11B.



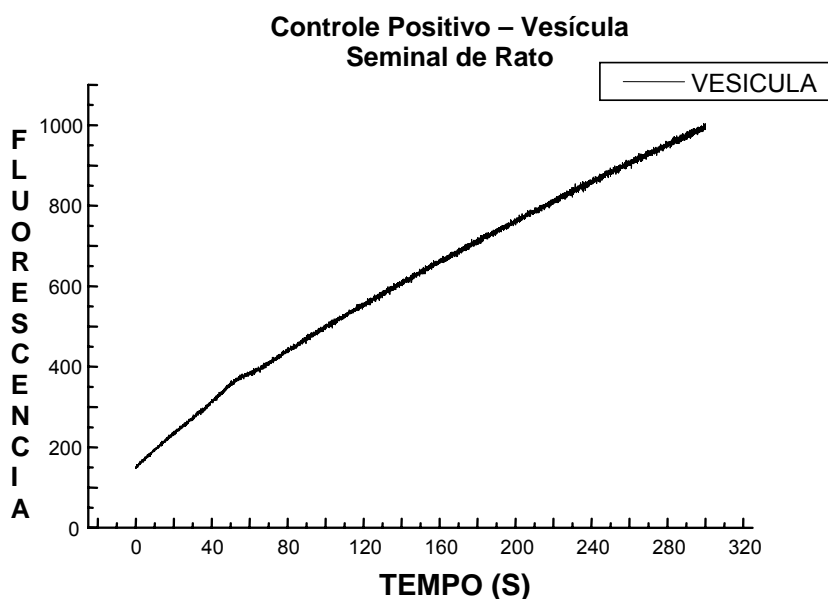
**Figura 11A:** Gráfico mostrando os diferentes valores de fluorescência para diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. Cada reação continha HVA 1mM; HRP 1,4μM; DTT 150μM; Tampão Pi 50mM, 0,3mM EDTA pH 7,5 qsp 500μL. As concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estão indicadas na legenda.

As atividades enzimáticas foram calculadas utilizando-se a curva de calibração (fig. 11B).



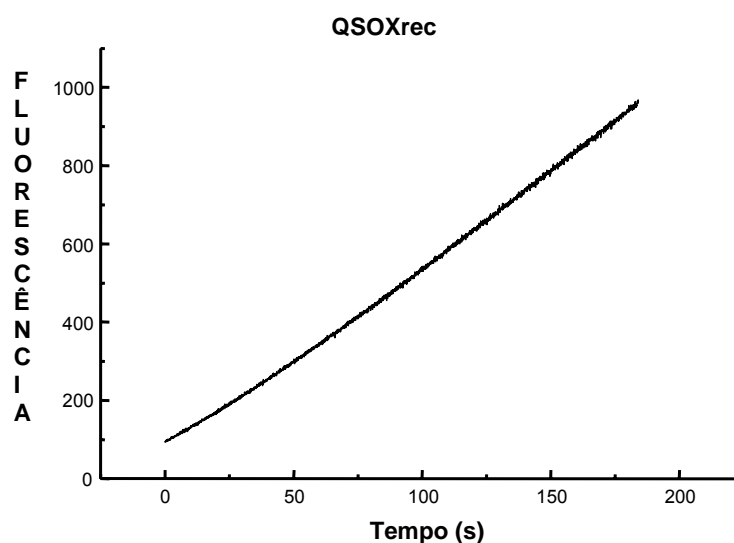
**Figura 11B:** Curva de calibração obtida a partir da incubação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> autêntico com 150μM DTT; 1,4μM HRP; 1mM HVA em Tampão Pi 50mM, pH 7.5, 0.3mM EDTA. As concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram 0,0; 0,2; 0,4; 0,8μM, respectivamente. Equação da reta:  $Y = 24 + 202.85 X$ .

A figura 12 mostra um controle positivo para o ensaio. Nesta reação foi utilizada uma amostra de vesícula seminal de rato (ver item 3.13 material e métodos), que contém sulfidril oxidase (BENAYON et al. 2001). A presença da sulfidril oxidase dependente de FAD de rato foi demonstrada em diversos tecidos (TURY et al., 2006). O seqüenciamento da QSOX de rato parcial mostrou que esta possui homologia a seqüência da quiescina humana Q6. A clonagem do cDNA da QSOX de vesícula seminal de rato e sua expressão em células epiteliais ovarianas de hamster chineses foi mostrada (BENAYOUN *et al.* 2001), e análises de Northern blot e PCR mostram que existem pequenas quantidades da enzima em tecidos como testículos, próstata, pulmão, coração, rins, pâncreas e fígado e que há alta taxa de expressão do gene na vesícula seminal e epidídimo (TURY et al., 2006; THORPE, 2002; MATSUBA et al., 2002).



**Figura 12:** Formação de peróxido de hidrogênio a partir de uma incubação de extrato total de vesícula seminal de rato (16µg/uL), usando DTT como substrato. Na reação 150µM de DTT; 1,4µM de HRP; 1mM de HVA; 50µL de extrato total de vesícula seminal de rato e Tampão Pi 50mM qsp 500µL foram misturados.

Vários trabalhos demonstram a habilidade das enzimas QSOX atuarem na formação de pontes dissulfeto em outras proteínas (HOOBER *et al.*, 1999). Em contraste pouco se conhece sobre seus possíveis substratos fisiológicos. A QSOX1 é uma proteína secretada ou presente no citoplasma celular em vesículas, em cisternas ou grânulos densos que brotam a partir do complexo de Golgi (MAIRET-COELLO, *et al.*, 2004). Também foi demonstrado pelo grupo de Buleid, que a QSOX1 humana é capaz de complementar a função da proteína Ero1 em levedura, podendo esta também ser substituída pela enzima (QSOX1) (CHAKRAVARTHI, *et al.*, 2007). Thorpe (2002) também demonstra a presença da QSOX em diversas localidades celulares entre elas o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi. A figura 13 mostra a atividade da QSOXrec produzida em nosso laboratório, usando como substrato o DTT. Para isto foi realizado um ensaio, em que a proteína QSOXrec foi adicionada na reação, para comprovação da produção de peróxido de hidrogênio como produto final da reação das sulfidril oxidases que atuam sobre seus substratos.



**Figura 13:** Atividade sulfidril oxidase da QSOXrec. Atividade da QSOXrec 5 $\mu$ l (0.4 $\mu$ g/ $\mu$ l), incubada com 150 $\mu$ M DTT; 1,4 $\mu$ M HRP; 1mM HVA em Tampão Pi 50mM, pH 7.5, 0.3mM EDTA.

As medidas de atividade para a sulfidril oxidase endógena de vesícula seminal e líquido seminal de rato (gráfico não mostrado) foram observadas pela elevação da fluorescência que ocorre pelo aumento da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela enzima (Fig. 12 e 13). Estas reações utilizaram o DTT como substrato. O DTT mostrou-se um bom substrato, tanto para sulfidril oxidase de ave como de mamíferos (OSTROWSKI et al., 1980; HOOBER et al., 1996). O grupo de Thorpe, que desenvolveu um método para medida de atividade, o qual, foi usado neste trabalho, mostra um ensaio correspondente à fluorescência do HVA com enzima purificada de galinha usando DTT e RNase como substrato (RAJE et al., 2002). O trabalho também mostra a atividade de sulfidril oxidases de diferentes tecidos além da enzima de clara de ovo de galinha, entre eles, vesícula seminal de boi, fígado de porco, gordura do leite e até mesmo lágrimas humanas, sugerindo que a atividade da sulfidril oxidase é bem distribuída na natureza (HOOBER, et al., 1996; BENAYOUN et al., 2002; COPPOCK et al., 1998; COPPOCK et al., 2000). A presença de QSOX em diferentes secreções sugere que esta enzima participa no dobramento oxidativo de proteínas secretadas, e possivelmente no modelamento da matriz extracelular, no controle do ciclo e na adesão celular (THORPE et al., 2002). A QSOX recombinante produzida em nosso laboratório também demonstra atividade usando DTT como substrato (Fig. 13). Utilizamos também outros substratos além do DTT, entre eles, glutatona oxidada (GSSG), glutatona reduzida

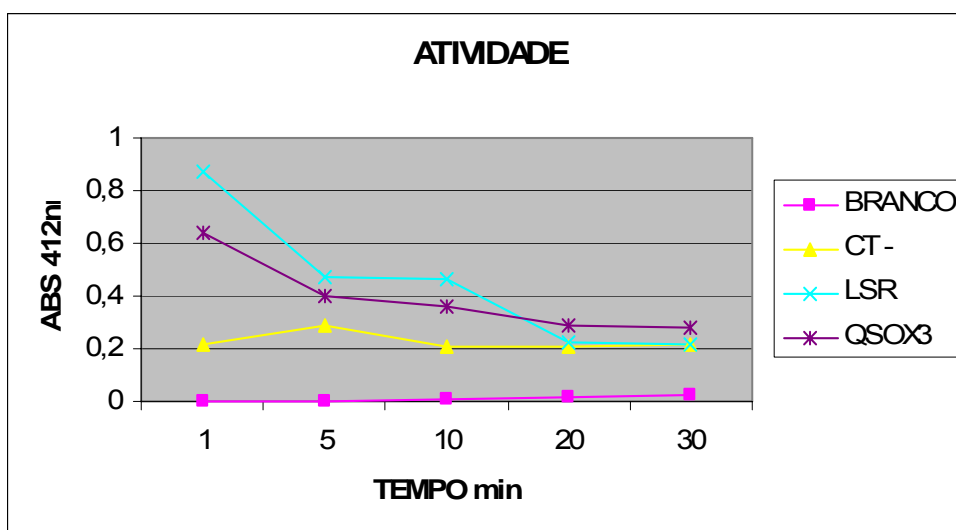
(GSH) e cisteína. Substratos com alto valor de  $K_m$ , como a glutatona (20mM) e cisteína (10.9mM) (HOOBER et al., 1996) utilizada nos experimentos, não parecem ser ideais para medida de atividade por este método (HOOBER et al., 1996; RAJE et al., 2000), devido à alta concentração do substrato na reação. Embora estes valores elevados de  $K_m$ , foi possível sua utilização, também como foi observado no trabalho de Raje, 2000. O GSSG, que não possui grupos tióis livre, e sim oxidados, funciona como um controle negativo da reação, não sendo possível a interação da enzima com esse substrato (resultado não mostrado) e a cisteína possui um grupamento sulfidril livre, o qual é passível de oxidação pela QSOX recombinante.

**Tabela 1 – Atividade da QSOX recombinante frente a diferentes substratos**

Tipo de Substrato	Quantidade de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> produzido: nmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> de proteína
	QSOX recombinante
GSSG	Ausência de atividade
GSH	68.58
Cisteína	17.50
DTT	18.70

#### 4.6.2 Medida da atividade enzimática da QSOXrec pelo método do DTNB

A oxidação do DTT pela sulfidril oxidase endógena e a enzima recombinante, de acordo com o tempo de reação, é mostrada na figura 14. Para este experimento foram feitos quatro tubos de reação: um controle negativo (2mM DTT; 100mM Tris pH 8.0), um controle positivo com líquido seminal de rato (2mM DTT; 100mM Tris pH 8.0; 30ug/uL LSR) e uma reação com a QSOXrec (2mM DTT; 100mM Tris pH 8.0; 30ug/uL QSOXrec) e um branco (Tris 100mM pH 8.0). Nos determinados tempos, 1 min, 5 min, 10 min, 20 min e 30 min uma alíquota de 10μL da reação era retirada e reagida com 0.5mM DTNB em Tris-HCl pH 8.0 100mM e a absorbância medida em espectrofotômetro em 412nm. O consumo do substrato DTT pela sulfidril oxidase faz com que os tióis reduzidos do DTT se tornem oxidados, com isso diminuindo os valores de absorbância.



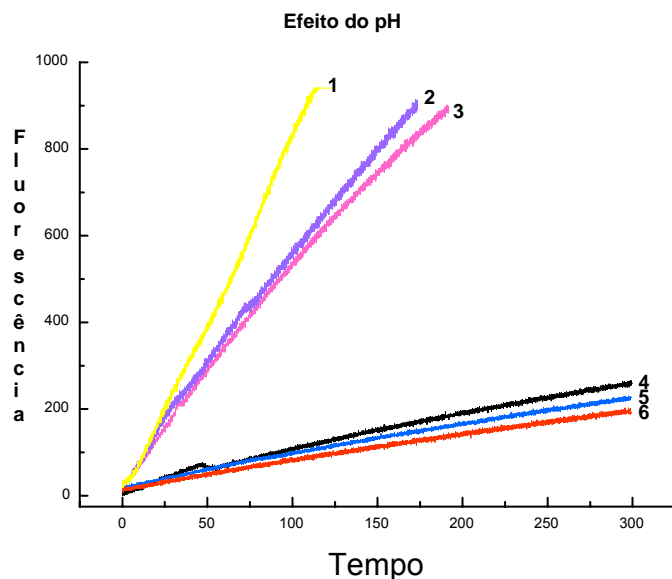
**Figura 14:** Efeito sulfidril oxidase usando DTT como substrato. CT -, controle negativo (DTT 2mM em Tris-HCl 100mM pH 8.0); LSR, 30 $\mu$ g de líquido seminal de rato, 2mM DTT em 100mM Tris-HCl pH 8.0, usado como controle positivo no experimento; QSOX3, 0,006 $\mu$ g de sulfidril oxidase recombinante de camundongo, DTT 2mM. Em tempos determinados, alíquotas de 10 $\mu$ L das três reações foram reagidas com DTNB 0,5mM. Absorvância foi medida em 412nm.

Nas duas metodologias utilizadas conseguimos verificar a oxidação do substrato DTT quando incubado com a proteína recombinante produzida. Isso mostra que a QSOX recombinante produzida, possui atividade específica para este substrato, diferentemente dos resultados obtidos pelo grupo de Suga (MATSUBA *et al.*, 2002), no qual, a proteína recombinante QSOX clonada de epiderme de camundongo e expressa em células HEK e Pt-K2 não obteve atividade enzimática. A enzima isolada de epiderme de camundongo também foi testada com possíveis substratos tióis. Entre eles, cisteína, DTT e glutathione. O trabalho mostra que não foi observada atividade enzimática da QSOX isolada de camundongo. Em nossos resultados (Tabela 1), praticamente não houve diferença entre os substratos DTT e cisteína, com valores de atividade de 18.70 e 17.50nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>, respectivamente. Entretanto, a GSH apresentou um valor 3.5 vezes maior, sugerindo que a enzima tem preferência pela glutathione. Nosso grupo ainda mostra que a QSOX está presente no soro fetal bovino, mas apresenta níveis diminuídos após o nascimento (ZANATA *et al.*, 2005). Além da presença da QSOX no soro fetal bovino, foi determinada a atividade sulfidril oxidase no sêmen e em amostras de soro, empregando-se o método de fluorescência do ácido homovanílico e HRP descrito por Raje (2002). Os valores de atividade sulfidril oxidase,

pela produção de peróxido de hidrogênio encontrados no sêmen bovino foram de  $0.22 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína total. O soro fetal bovino também apresentou atividade com produção de peróxido de  $4.2 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína total.

#### 4.7 Efeito do pH na atividade da QSOXrec produzida

Quase todos os processos biológicos são dependentes do pH, uma pequena variação no pH produz uma grande variação na velocidade do processo. As enzimas têm um intervalo de pH no qual a sua atividade é máxima. Em um pH maior ou menor, a atividade diminui. A Fig.15 mostra o efeito do pH na oxidação do DTT por diferentes sulfidril oxidases. Para este experimento, todas as amostras foram utilizadas com tampão Pi 50mM, 0.3mM EDTA, pH 6.5 – 8.0. A atividade da enzima parece ser dependente do pH no qual ocorre a reação. Hooper em 1996, mostrou a influência do pH na atividade da sulfidril oxidase de clara de ovo de galinha. Este trabalho evidencia que as sulfidril oxidases atuam em faixas de pH entre 5.0 e 11.0 (HOOPER et al., 1996), tendo como valores ideais entre 6.5 e 8.5. As enzimas de clara de ovo de galinha, líquido seminal de rato e vesícula seminal também demonstraram atividade na faixa de pH entre 6.0 e 8.5. Porém, maiores valores de fluorescência foram obtidos em reações com pH 8.0, como mostra a Fig. 15



**Figura 16.** Dependência do pH na atividade de diferentes sulfidril oxidases frente ao DTT. A atividade sulfidril oxidase das enzimas de vesícula seminal, clara de ovo de galinha e líquido seminal foram medidas pelo método do ácido homovanílico usando  $150 \mu\text{M}$  de DTT. Vesícula seminal (1), clara de ovo (2) e líquido seminal (3) em pH 8.0; líquido seminal (4), clara de ovo (5) e vesícula seminal (6) em pH 6.5.



Como os resultados obtidos pelo grupo de Thorpe, que relata a purificação da SOX endógena e a medida de sua atividade (HOOBER et al. 1996; HOOBER et al., 1999), a Tabela 2 mostra os valores de atividade encontrados com diferentes valores de pH 6.5 – 8.0 nas reações com QSOX recombinante de camundongo produzida, comparando com enzimas de tecidos diferentes.

**Tabela 2. Atividade Sulfidril Oxidase em pH diferente usando DTT**

AMOSTRA	Quantidade de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> produzido: nmol. min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> de proteína		
	pH		
	6.5	7.5	8.0
Clara de ovo	0.40	1.68	3.50
Vesícula Seminal	1.90	5.05	31.60
Líquido Seminal	7.30	14.72	41.83
QSOX rec	4,29	18.70	35.42

Em pH 6.5 as amostras apresentam diminuição na atividade enzimática quando comparado com os valores encontrados em pH 7.5 e 8.0, em que as amostras apresentam aumento de atividade. O efeito do pH na atividade da sulfidril oxidase, também foi mostrado pelo grupo de Lo Gorton, um aumento significativo entre pH 6.5 e 8.0, e diminuição da atividade em valores de pH maiores que 8.2 (TIMUR et al., 2007). Os resultados aqui encontrados mostram que ocorreu a produção e a purificação da QSOX recombinante humana e de camundongo, embora não foi possível a obtenção da proteína humana ativa (dados não mostrados). Este fato sugere a troca do sistema de expressão com seis histidinas por outros mais eficientes, como por exemplo, o sistema GST (glutathione S-transferase – Amersham), que trazem como vantagens o aumento da solubilidade da proteína, e a possibilidade de realizar lise nativa entre outras. Tal hipótese já está sendo estudada. No momento apenas a proteína de camundongo possui atividade, e esta se altera conforme o pH da reação (TIMUR et al., 2007; HOOBER et al., 1996; HOOBER et al., 1999). Sendo assim, a proteína recombinante produzida em nosso laboratório dará suporte para os próximos experimentos na tentativa de encontrar possíveis funções da QSOX.

## 5 CONCLUSÕES

- As proteínas recombinantes 6HIS-QSOXm e 6HIS-SOXh foram expressas em sistema heterólogo de *E. coli*;
- Ambas foram purificadas em coluna de Ni-NTA;
- A enzima 6HIS-QSOXm produzida apresenta atividade enzimática com substratos conhecidos como o DTT, GSH e cisteína;
- A atividade enzimática da QSOX recombinante murina se altera em valores de pH diferentes (6.5 – 8.0).

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, R.G.; TRESINI, M. **Oxidative stress and gene regulation.** Free Radic. Biol. Med. (2000) 28: 463-499

ACHEBACH, S.; TRAN, Q.H.; VLAMIS-GARDIKAS, A.; MULLNER, M.; HOLMGREN, A.; UNDEN, G. **Stimulation of Fe/S cluster insertion into apoFNR by *Escherichia coli* glutaredoxins 1, 2, and 3 in vitro.** FEBS (2004) 565: 203-206

AHAMED, M. AND SIDDIQUI, M.K.J. **Low level lead exposure and oxidative stress: Current opinions.** Clinica Chimica Acta (2007) 383: 57-64

AMIOT, C.; MUSARD, J.F.; HADJIYIASSEMIS, M.; JOUVENOT, M.; FELLMAN, D.; RISOLD, P.Y.; ADAMI, P. **Expression of the secreted FAD-dependent sulphhydryl oxidase (QSOX) in the guinea pig central nervous system.** Mol. Brain Res. (2004) 125: 13-21

ANGELINI G, GARDELLA S, ARDY M, CIRIOLO MR, FILOMENI G, DI TRAPANI G, CLARKE F, SITIA R, RUBARTELLI A. **Antigen-presenting dendritic cells provide the reducing extracellular microenvironment required for T lymphocyte activation.** Proc Natl Acad Sci U S A. 3 (2002) 1491-6.

ARNÉR, E.S.J.; HOLMGREN, A. **Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase.** Eur. J. Biochem. (2000) 267: 6102-6109

BENAYOUN, B.; ESNARD-FÈVE, A.; CASTELLA, S.; COURTY, Y.; ESNARD, F. **Rat seminal vesicle FAD-dependent sulphhydryl oxidase. Biochemical characterization and molecular cloning of a member of the new sulphhydryl oxidase/quiescin Q6 gene family.** J. Biol. Chem. (2001) 276: 13830-13837

BENHAM, A.M.; CABIBBO, A.; FASSIO, A.; BULLEID, N.; SITIA, R.; BRAAKMAN, I. **The CXXCXXC motif determines the folding, structure and stability of human Ero1- $\alpha$ .** EMBO J. (2000) 19: 4493-4502.

BERTINI, R.; HOWARD, Z.; DONG, H.F.; OPPENHEIM, J.J.; BIZARRI, C.; SERGI, R.; CASELLI, G.; PAGLIEI, S.; ROMINES, B.; WILSHIRE, J.A.; MENGOZZI, M.; NAKAMURA, H.; YODOI, J.; PEKKARI, K.; GURUNATH, R.; HOLMOGREN, A.; HERZENBERG, L.A.; HERZENBERG, L.A.; GHEZZI, P. **Thioredoxin, a redox enzyme released in infection and inflammation, is a unique chemoattractant for neutrophils, monocytes, and T Cells.** J. Exp. Med. (1999) 189: 1783-1789

BRADFORD MARION M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical Biochemistry, Volume 72, Issues 1-2, 7 May 1976, Pages 248-254

BRION, M.; CUINÉ, S.; PELTIER, G.; REY, P. **Involvement of CDSP 32, a drought-induced thioredoxin, in the response to oxidative stress in potato plants.** FEBS (2000) 467: 245-248

CHAKRAVARTHI, S. AND BULLEID, J. **Glutathione is required to regulate the formation of native disulfide bonds within proteins entering the secretory pathway.** J. Biol. Chem. (2004) 279, 39872–39879

CHAKRAVARTHI, S.; JESSOP, C.E.; WILLER, M.; STIRLING, C.J.; BULLEID, N.J. **Intracellular catalysis of disulfide bond formation by the human sulfhydryl oxidase, QSOX1.** Biochem. J. (2007) 404: 403-411

CHOI, C.; KIM, B.; LEE, C.; KIM, J.; PARK, S.; YIM, H.; KANG, S. **Reduced glutathione levels affect the culmination and cell fate decision in Dictyostelium discoideum.** Devel. Biol. (2006) 295: 523-533

CLARE, D.A.; PINNIX, I.B.; LECCE, J.G.; HORTON, H.R. **Purification and properties of sulfhydryl oxidase from bovine pancreas.** Arch. Biochem. Biophys. (1998) 265: 351-361

CLINE, D.; THORPE, C.; SCHNEIDER, J.P. **Structure-based design of a fluorimetric redox active peptide probe.** Annal. Biochem (2004) 325: 144-150

COPPOCK, D.; KOPMAN, C.; GUDAS, J.; CINA-POPPE, D. **Regulation of the quiescence-induced genes: quiescin Q6, decorin, and ribosomal protein S29.** Biochem. Biophys. Res. Commun. (2000) 269: 604-610

COPPOCK, D.L.; CINA-POPPE, D.; GILLERAN, S. **The quiescin Q6 gene (QSCN6) is a fusion of two ancient gene families: thioredoxin and ERV1.** Genomics (1998) 54: 460-468

COPPOCK, D.L., KOPMAN, C., SCANDALIS, S., GILLERAN, S. **Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts.** Cell Growth & Differ. (1993) 4: 483-493

COPPOCK L. D.; THORPE, C. **Multi-domain Flavin-dependent Sulfhydryl Oxidases.** Antiox. Redox. Sign. 2005

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; COLOMBO, R.; MILZANI, A. **S-glutathionylation in protein redox regulation.** Free Rad. Biol. Med. Article in press (2007)

DE LA MOTTE, R.S., WAGNER, F.W. **Aspergillus niger sulfhydryl oxidase.** Biochemistry (1987) 26: 7363-7371

ELLERMAN, D.A.; MYLES, D.G.; PRIMAKOFF, P. **A role for sperm surface protein disulfide isomerase activity in gamete fusion: Evidence for the participation of ERp57.** Develop. Cell (2006) 10: 831-837

ELLIS, E.M. **Reactive carbonyls and oxidative stress: Potential for therapeutic intervention.** Pharm. Therap. (2007) 115: 13-24

ESSEX, D. W.; L, M FEIMMAN, R. D; MILLER, A. **The Role of Thiols and Dissulfides in Platelet Function.** Antiox. Redox. Signal. 6 (2004) 736-746

FRAND, A.R AND KAISER, C.A. **Ero1p oxidizes protein disulfide isomerase in a pathway for disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum.** Molec. Cell (1999) 4: 469-477

FRAND, A.R AND KAISER, C.A. **The ERO1 gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum.** Molec. Cell (1998) 1: 161-170

GANDHI, C.R., KUDDUS, R., SUBBOTIN, V.M., PRELICH, J., MURASE, N., RAO, A.S. NALESNIK, M.A., WATKINS, S.C, DELEO, A., TRUCCO, M., STARLZ, T.E. **A fresh look at argumenter of liver regeneration in rats.** Hepathology (1999) 29: 1435-1445

GERBERT, J.; MUHLENHOFF, U.; HOFHAUS, G.; LILL, R.; LISOWSKY, T. **Yeast Ery2p is the first microsomal FAD-linked sulfhydryl oxidase of the Ery1p/ALRp protein family.** J. Biol. Chem. (2001) 276: 23486-23491

GIUSTARINI, D.; DALLE-DONNE, I.; COLOMBO, R.; MILZANI, A.; ROSSI, R. **An Improved HPLC Measurement for GSH and GSSG in Human Blood.** Free Radical & Medicine 15 (2003) 1365-1372.

GÖRLACH, A., BRANDES, R.P.; BASSUS, S. et al. **Oxidative stress and expression of p22phox are involved in the up-regulation of tissue factor in vascular smooth muscle cells in response to activated platelets.** FASEB. J. (2000) 14: 1518-1528

GROSS, E.; SERVIER C.S; HELDMAN, N.; VITU, E.; BENTZUR, M.; KAISER, C.; THORPE.; FASS, D. **Generating disulfides enzymatically: Reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p.** PNAS (2006) 103: 299-304.

HOOBER KL, THORPE C. **Flavin-dependent sulfhydryl oxidases in protein disulfide bond formation.** Methods Enzymol. (2002) 348-304.

HOOBER, K., JONESA, B., WHITE III, H.B., THORPE, C. **A sulfhydryl oxidase from chicken egg.** J. Biol. Chem. (2001) 271: 30510-30516

HOOBER, K., SHEASLEY, S.L., GILBERT, H.F., THORPE, C. **Sulfhydryl oxidase from egg white. A facile catalyst for disulfide bond formation in proteins and peptides.** J. Biol. Chem. (1999a) 274: 22147-22150

HOOBER, K., GLYNN, N.M., BURNSIDE, J., COPPOCK, D.L., THORPE, C. **Homology between egg white sulfhydryl oxidase and quiescin Q6 defines a new class of flavin-linked sulfhydryl oxidases.** J. Biol. Chem. (1999b) 274: 31759-31762

HORIBE, T.; IGUCHI, D.; MASUOKA, T.; GOMI, M.; KIMURA, T.; KIKUCHI, M. **Replacement of domain b of human portein disulfide isomerase-related protein with domain b' of human protein disulfide isomerase dramatically increases its chaperone activity.** FEBS Lett. (2004) 566: 311-315

JANOLINO, V.G., SWAISGOOD, H.E. **Isolation and characterization of sulfhydryl oxidase from bovine milk.** J. Biol. Chem. (1975) 250: 2532-2538

JIANG, X.; FITZGERALD, M.; GRANT, C.M.; HOGG, P.J. **Redox Control of Exofacial Protein Thiol/Dissulfides by Protein Dissulfide Isomerase.** J. Biol. Chem. 274 (1999) 2416-2423

JONES, D. P; CARLSON, J. L; MODY, V. C; CAI, J; LYNN, M. J; STERNBERG, P. **Redox State of Glutathione in Human Plasma.** Free Radical & Medicine. (1999) 28: 625-635

JORDAN, P.A.; STEVENS, J.M.; HUBBARD, G.P.; BARRET, N.E.; SAGE, T.; AUTHI, K.S.; GIBBINS, J.M. **A role for the thiol isomerase protein ERP5 in platelet function.** Blood 105 (2005) 1500-1507

JUNG, T.; BADER, N.; GRUNE, T. **Oxidized proteins: intracellular distribution and recognition by the proteasome.** Arch. Biochem. Biophys. (2007) 462: 231-237

KLEIMAN, W. A; KOMNINO, D.; LEUTZINGER, Y.; COLOSIMO, S.; COX, J.; LANG, C.; RICHIE, J. **Protein glutathiolation in Human Blood.** Bioch. Pharm. 65 (2003) 741-746

LANG, H.; LISOWSKY, T.; GERBER, J.; MUHLENHOFF, U.; KISPAL, G.; LILL, R. **An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins.** EMBO (2001) 2: 715-720

LARAGIONE, T.; SONETTO, V.; CASONI, F.; MASSIGNAN, T.; BIANCHI, G.; GIANAZZA, E.; GHEZZI, P. **Redox Regulation of Surface Thiols: Identification of Integrin  $\alpha$ -4 as a molecular target by using redox proteomics.** PNAS 100 (2003) 14737-14741

LARAGIONE, T.; GIANAZZA, E.; TONELLI, R.; BIGINI, P.; MENNINI, T.; CASONI, F.; MASSIGNAN, T.; BONETTO, V.; GHEZZI, P. **Regulation of redox-sensitive exofacial protein thiols in CHO cells.** Biol. Chem. (2006) 387: 1371-1376

LASH, L.H., JONES, D.P., ORRENIUS, S. **The renal thiol (glutathione) oxidase. Subcellular localization and properties.** Biochem. Biophys. Acta (1984) 779: 191-200

LEE, J.E., HOFHAUS, G., LISOWSKY, T. **Erv1p from *Saccharomyces cerevisiae* is a FAD-linked sulfhydryl oxidase.** FEBS Lett. (2000) 447: 62-66

LI LI JI. **Antioxidant signaling in skeletal muscle: A brief review.** Exp. Gerontol. (2007) 42: 582-593

LISOWSKY, T.; LANGE, H.; GERBER, J. MUHLENHOFF, U.; KISPAL, G.; LILL, R. **An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins.** EMBO 21 (2001) 715-720

LUNDSTROM-LJANG, J.; VLAMIS-GARDIKAS, A.; ASLUND, F.; HOLMGREN, A. **Reactivity of glutaredoxins 1, 2 and 3 from *Escherichia coli* and protein**

**disulfide isomerase towards glutathionyl-mixed disulfides in ribonuclease A.** FEBS (1999) 443: 85-88

MAIRET-COELLO, G., TURY, A., FELLMAN, D.; JOUVENOT, M.; GRIFFOND, B. **Expression of Sox-2 a member of the FAD-dependent sulfhydryl oxidase /quiescin Q6 gene family, in rat brain.** Neuroreport. (2002) 13: 2049-2051

MARTÍNEZ-RUIZ, A. AND LAMAS, S. **Signaling by NO-induced S-nitrosylation and S-glutathionylation: convergences and divergences.** Cardio. Reas. (2007) 75: 220-228

MATSUBA, S.; SUGA, Y.; ISHIDOH, K.; HASHIMOTO, Y.; TAKAMORI, K.; KOMINAMI, E.; WILHELM, B.; SEITZ, J.; OGAWA, H. **Sulfhydryl oxidase (Sox) from mouse epidermidis: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of recombinant protein in the cultured cells.** J. Dermatol Sci. (2002) 30: 50

MUSARD, J.F.; SALLOT, M.; DULIE, P.; FRAICHARD, A.; ORDENER, C.; REMY-MARTIN, J.P.; ADAMI, P. **Identification and expression of a new sulfhydryl oxidase Sox-3 during cell cycle and the estrus cycle in uterine cells.** Biochem. Biophys. Res. Commun. (2001) 287: 83-91

NAKAMURA, H.; NAKAMURA, K.; YODOI, J. **Redox Regulation of Cellular Activation.** Annu. Rev. Immunol. 15 (1997) 351-369

NAVARRO, M.M.M.; CASAS, C.; PIEDRAFITA, L.; BELLI, G.; HERRERO, E. **Prokaryotic and eukaryotic monothiol glutaredoxins are able to perform the functions of Grx5 in the biogenesis of Fe/S clusters in yeast mitochondria.** FEBS (2006) 580: 2273-2280

NOIVA, R. **Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum.** Semin Cell Dev Biol. 5 (1999) 481-493

OSTROWSKI, M.C.; KISTLER, W.S. **Properties of a flavoprotein sulfhydryl oxidase from rat seminal vesicle secretion.** Biochemistry (1980) 19: 2639-2645

PELTONIEMI, M.J.; KARALA, A.; JURVANSUU, J.K.; KINNULA, V.L.; RUDDOCK, L.W. **Insights into deglutathionylation reactions: Different intermediates in the glutaredoxin and protein disulfide isomerase catalyzed reactions are defined by the  $\gamma$ -linkage present in glutathione.** J. Biol. Chem. (2006) 281: 33107-33114

POLLARD, M.G.; TRAVERS, K.J.; WEISSMAN, J.S. **Ero1p: A novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum.** Molec. Cell. (1998) 1: 171-182

POWIS, G. AND MONTFORT, W.R. **Properties and biological activities of thioredoxins.** Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2001) 30: 421-455

RAJE, S.; GLYNN, N.M.; THORPE, C. **A continuous fluorescence assay for sulphhydryl oxidase.** Anal. Bioch. 307 (2002) 266- 272

ROUHIER, N.; GELHAYE, E.; JACQUOT, J. **Exploring the active site of plant glutaredoxin by site directed mutagenesis.** FEBS (2002) 511: 145-149

SAHAF, B.; HEYDARI, K.; HERZENBERG, L.A.; HERZENBERG, L.A. **The extracellular microenvironment plays a key role in regulating the redox status of cell surface proteins in HIV-infected subjects.** Arch. Bioch. Bio. 434 (2005) 26-32

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: USA. 2001

SEVIER CS, CUOZZO JW, VALA A, ASLUND F, KAISER CA. **A flavoprotein oxidase defines a new endoplasmic reticulum pathway for biosynthetic disulphide bond formation.** Nat Cell Biol. (2001) 10: 874-82.

SENKEVICH TG, WHITE CL, KOONIN EV, MOSS B. **A viral member of the ERV1/ALR protein family participates in a cytoplasmic pathway of disulfide bond formation.** Proc Natl Acad Sci U S A. 22 (2000) 12068-120673.

SMITH, J. W.; YAN, B.; LANDRY, F.; LOMBARDO, C.R. **Redox Control of Integrin Adhesion Receptors.** Methods Enzymol. 353 (2002) 156-163

SLIKOVIC, I. AND MUTUS, B. **Reversible inhibition of caspase-3 activity by iron(III) potential role in physiological control of apoptosis.** FEBS Lett. (2006) 580: 2233-2237

TAKAMORI, K.; THORPE, J.M.; GOLDSMITH, L.A. **Skin sulfhydryl oxidase. Purification and some properties.** Biochem. Biophys. Acta (1980) 615: 309-323

TIAN, G.; XIANG, S.; NOIVA, R.; LENNARZ, W.J.; SCHINDLIN. **The crystal structure of yeast protein disulfide isomerase suggests cooperativity between its active sites.** Cell (2006) 124: 61-73

TIMUR, S.; ODACI, D.; DINCER, A.; ZIHNIOGLU, F.; TELEFONCU, A.; GORTON, L. **Sulfhydryl oxidase modified composite electrode for the detection of reduced thiolic compounds.** Sens. Actua. B. (2007) 125: 234-239

THORPE, C.; HOOBER, K.L.; RAJE, S.; GLYNN, N.M.; BURNSIDE, J.; TURI, G.K.; COPPOCK, D.L. **Sulfhydryl oxidase: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes.** Arch. Biochem. Biophys. (2002) 405: 1-12

THORPE, C; COPPOCK, D.L. **Generating disulfides in multicellular organisms: emerging roles for a new flavoprotein family.** J. Biol. Chem. (2007) 1- 29

THORPE, C; COPPOCK, D.L. **Multi-domain flavin-dependent sulfhydryl oxidases.** J. Biol. Chem. Article in Press (2005)

TURANO, C.; COPPARI, S.; ALTIERI, F.; FERRARO, A. **Proteins of the PDI family: Unpredicted Non-ER Locations and Functions.** J. Cell Phys.193 (2002) 154-163



TURY, A.; MAIRET-COELLO, G.; ESNARD-FÈVE, A.; BENAYOUN, B.; RISOLD, P.; GRIFFOND, B.; FELLMAN, D. **Cell-specific localization of the sulphhydryl oxidase QSOX in rat peripheral tissues.** Cell Tissue Res. (2006) 323: 91-101

VITU, E.; BENTZUR, M.; LISOWSKY, T.; KAISER, C.A. **Gain of function in an ERV/ALR sulphhydryl oxidase by molecular engineering of the shuttle disulfide.** J. Mol. Biol. (2006) 362: 89-101

WANG, P.; MARCINKEVICIENE, J.; WILLIAMS, C.H.; BLANCHARD, J. **Thioredoxin reductase – Thioredoxin fusion enzyme from *Mycobacterium leprae*: comparison with the separately expressed thioredoxin reductase.** Biochem. (1998) 37: 16378-16389

WILLIAMS, C.H.; ARSCOTT, L.D.; MULLER, S.; LENNON, B.W.; LUDWIG, M.; WANG, P.; VEINE, D.M.; BECKER, K.; SCHIRMER, R.H. **Thioredoxin reductase: two models of catalysis have evolved.** Eur. J. Biochem. (2000) 267: 6110-6117

WINTER, A.D.; McCORMACK, G.; PAGE, A.P. **Protein disulfide isomerase activity is essential for viability and extracellular matrix formation in the nematode *Caenorhabditis elegans*.** Develop. Bio. Article in Press, 2007

WITTKE I, WIEDEMEYER R, Pillmann A, Savelyeva L, Westermann F, and Schwab M. **Neuroblastoma-derived sulphhydryl oxidase, a new member of the sulphhydryl oxidase/Quiescin6 family, regulates sensitization to interferon gamma-induced cell death in human neuroblastoma cells.** Cancer Res 63: 7742-7752, 2003.

YAN, B.; SMITH, J.W. **Mechanism of Integrin Activation by Disulfide Bond Reduction.** Bioch. 30 (2001) 8861-8867

ZANATA, S.M.; LUVIZON, A.C.; BATISTA, D.F.; IKEGAMI, C.M.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; CHAVES, D.F.S.; CARON, L.F.; PELIZZARI, J.V.; LAURINDO, F.R.M.; NAKAO, L.S. **High level of active quiescin Q6 sulphhydryl oxidase (QSOX) are selectively present in fetal serum.** Redox. Report (2005) 10: 319-323